

**ANALISA KEKERABATAN BUAYA SENYULONG (*Tomistoma schlegelii*) BERDASARKAN GEN *Cytochrome C Oxidase* subunit I DENGAN MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION**

**SKRIPSI**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**ANALISA KEKERABATAN BUAYA SENYULONG (*Tomistoma schlegelii*) BERDASARKAN GEN *Cytochrome C Oxidase* subunit I DENGAN MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION**

**SKRIPSI**

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

**DINUL HAMDI**

**145130101111076**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN

### ANALISA KEKERABATAN BUAYA SENYULONG (*Tomistoma schlegelii*) BERDASARKAN GEN *Cytochrome C Oxidase* subunit I DENGAN MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Oleh:

**DINUL HAMDI**

**145130101111076**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 29 Juni 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS**  
NIP. 196005121987011001

**drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech**  
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dinul Hamdi  
NIM : 145130101111076  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul :

**Analisa Kekerabatan Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) berdasarkan Gen *Cytochrome C Oxidase Subunit I* dengan Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 Juni 2018  
Yang menyatakan,

**(Dinul Hamdi)**  
**NIM. 145130101111076**



**DAFTAR RIWAYAT HIDUP**

Nama : Dinul Hamdi

Tempat/tanggal lahir : Balai Tengah/31 Maret 1996

Alamat : Ds. Bukit Sari, Kec. Jujuhan ilir, Kab. Bungo, Prov. Jambi

Sekolah Asal : SMA Negeri 1 Sijunjung

Fakultas : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

No. Hp : 085365463706

E-mail : dinul.hamdi03@gmail.com

**Analisa Kekerabatan Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) berdasarkan  
Gen *Cytochrome C Oxidase subunit I* dengan Menggunakan  
Metode *Polymerase Chain Reaction***

**ABSTRAK**

Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) merupakan jenis buaya air tawar yang dilindungi keberadaannya di Indonesia. Penelitian mengenai analisa kekerabatan antar individu buaya Senyulong menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) pada gen *Cytochrome C Oxidase subunit I* (COI) perlu dilakukan demi mendukung upaya pelestariannya. Gen COI berukuran 479 bp diperoleh dari 3 sampel darah buaya Senyulong setelah melalui tahap isolasi DNA dan amplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer *forward* (HMD\_F) 5'-GCT TTT CTC CGC TTT CAT CG -3' dan *reverse* (HMD\_R) 5'-CCC ATA TAC CCG AAT GGT TC-3'. Sekuens yang diperoleh dari amplifikasi gen COI dianalisa untuk memperlihatkan kekerabatan antar sampel individu (*intraspecies*), lalu dibandingkan dengan Gharial (*Gavialis gangeticus*) dan buaya Irian (*Crocodylus novaeguineae*) (*interspecies*) menggunakan program BioEdit®, *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI, dan program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kekerabatan buaya Senyulong yang berada di Predator Fun Park (PFP) kota Batu Jawa Timur berhasil dideskripsikan berdasarkan Gen COI (*Cytochrome C oxidase subunit 1*) secara *intraspecies* maupun *interspecies*. Jarak genetik *intraspecies* sampel buaya Senyulong yang dibandingkan dengan sekuen gen COI buaya Senyulong *database* NCBI bernilai sama atau kurang dari 2%. Jarak genetik *interspecies* yang dibandingkan dengan Gharial (familia *Gavialidae*) bernilai 13% sampai 14,3%, sedangkan jika dibandingkan dengan buaya Irian (familia *Crocodylidae*) bernilai 15,7% sampai 16,4%.

Kata kunci : Buaya Senyulong, mtDNA, COI, PCR

**Senyulong Crocodile (*Tomistoma schlegelii*) Relationship Analysis based on  
Cytochrome C Oxidase subunit I Gen by Using  
Polymerase Chain Reaction Method**

**ABSTRACT**

Senyulong crocodile (*Tomistoma schlegelii*) is a freshwater crocodile protected by its existence. Research on the analysis of relationship between individual Senyulong crocodile using mitochondrial DNA (mtDNA) in the Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI) gene needs to be done in order to support conservation efforts. The 479 bp COI gene was obtained from 3 samples of Senyulong crocodile blood after passing through the DNA isolation and amplification stages using Polymerase Chain Reaction (PCR) with forward primer (HMD\_F) 5'-GCT TTT CTC CGT TTT CG CAT -3' and reverse (HMD\_R) 5'-CCC ATA TAC CCG AAT GGT TC-3'. Sequences obtained from COI gene amplification are analyzed for attempted kinship rates between individual samples (intraspecies), then compare with the Gharial (*Gavialis gangeticus*) and the New Guinea crocodile (*Crocodylus novaeguineae*) (interspecies) using BioEdit®, Basic Search Alignment Search Tool (BLAST) from the NCBI, and the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) program. The results showed that Senyulong crocodile relationship level located in Predator Fun Park (PFP) Batu city of East Java was successfully described by Genes COI (Cytochrome C oxidase subunit 1). The genetic distance intraspecies of Senyulong crocodile samples compared with gene sequences of Senyulong crocodile NCBI databases is equal or less than 2%. The genetic distance of the interspecies compared with the Gharial (Gavialidae family) is 13% to 14.3%, whereas when compared to Irian crocodile (Crocodylidae family) is 15.7% to 16.4%.

**Keywords :** *Tomistoma*, *mtDNA*, *COI*, *PCR*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Analisa Kekerabatan Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) berdasarkan Gen Cytochrome C Oxidase subunit 1 dengan Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction***” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS., drh. Herlina Pratiwi, M.Si., dan drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. drh. Aulia Firmawati, M.Vet., dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si., sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. drh. Irwanda Kusuma Wardhana sebagai dokter hewan Predator Fun Park atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.
5. Keluarga penulis, Ayah Syahrul, Ibunda Rawinis, serta kakak kandung Hasbi Wahyudi, Ade Irsyad, dan Khairdina Oktavia, atas segala

- pengorbanan, doa, materi, dan kasih sayang yang tak terhitung kepada penulis.
6. Keluarga besar Improve Kelawar (Kelompok Eksotik, Aquatik, dan Satwa Liar) yang telah memberi masukan, dorongan, semangat, dan pengetahuan tentang satwa liar, teman sejawat yaitu Seruni Umami Aziizalita, Andi Citra Septaningsih, Ahmad Ikhwan, Rifqi Rahman, dan Nur Jauharah Fitriani yang telah memberi masukan, motivasi, dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis, drh. Muhammad Abdillah yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan selama menjalankan penelitian, dan anggota kelas Deer yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

Tulisan ini jauh dari kesempurnaan, maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca agar lebih banyak manfaat yang dapat diambil. Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 29 Juni 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

### Halaman

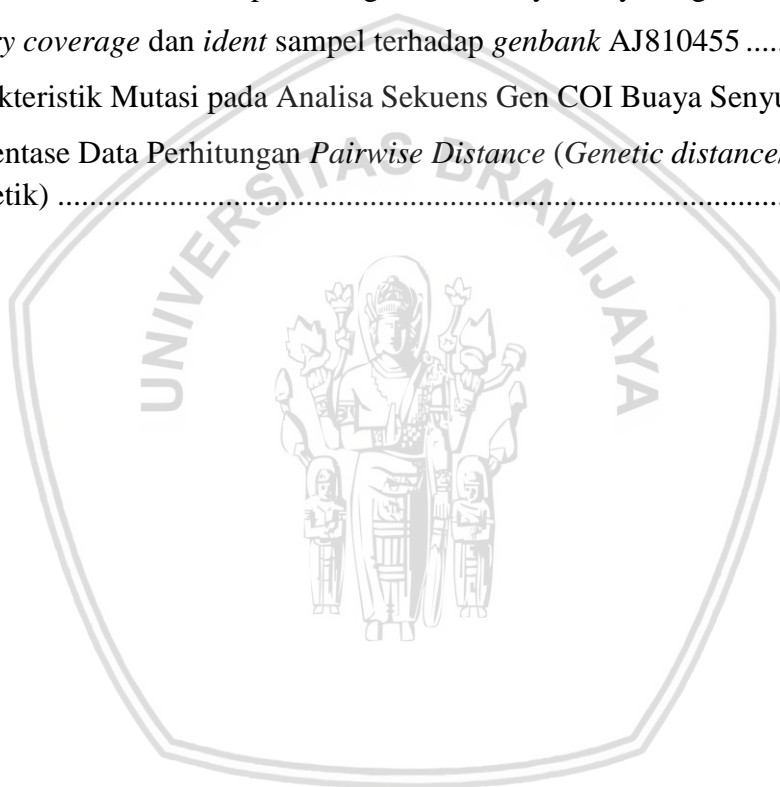
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	6
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Buaya Senyulong .....	7
2.2 DNA Mitokondria (mtDNA) .....	10
2.3 Gen Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI).....	11
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	12
2.4.1 Amplifikasi PCR.....	13
2.4.1.1 Denaturasi Untai Ganda DNA.....	14
2.4.1.2 Primer <i>Annealing</i> .....	15
2.4.1.3 DNA Polymerase <i>Extension</i> .....	16
2.5 Sekuensing DNA .....	17
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...</b>	<b>20</b>
3.1 Kerangka Konseptual.....	20

3.2 Hipotesis Penelitian .....	22
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
4.2 Pemilihan Sampel Buaya Senyulong.....	23
4.3 Alat dan Bahan .....	24
4.4 Tahapan Penelitian.....	24
4.5 Rancangan Penelitian.....	25
4.6 Prosedur Kerja .....	26
4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Buaya Senyulong .....	26
4.6.2 Isolasi DNA .....	26
4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA .....	26
4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA.....	26
4.6.3.2 Uji Kualitas DNA.....	27
4.6.4 Desain Primer .....	28
4.6.5 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	28
4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR.....	29
4.6.7 Sekuensing DNA .....	29
4.6.8 Analisa Data.....	29
<b>BAB 5 HASIL DNA PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
5.1 Isolasi, Amplifikasi, dan Sekuensing Gen COI .....	32
5.2 Analisa Sekuan Gen COI Buaya Senyulong .....	38
<b>BAB 6 PENUTUP .....</b>	<b>44</b>
6.1 Kesimpulan .....	44
6.2 Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>48</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Informasi individu sampel buaya Senyulong .....	23
5.1 Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA Buaya Senyulong ( <i>Tomistoma schlegelii</i> ) .....	33
5.2 Urutan Oligonukleotida Primer Gen COI Buaya Senyulong .....	35
5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen COI Buaya Senyulong .....	35
5.4 <i>Query coverage</i> dan <i>ident</i> sampel terhadap <i>genbank</i> AJ810455 .....	38
5.5 Karakteristik Mutasi pada Analisa Sekuens Gen COI Buaya Senyulong .....	38
5.6 Persentase Data Perhitungan <i>Pairwise Distance</i> ( <i>Genetic distance</i> /Jarak genetik) .....	40





## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi buaya Senyulong ( <i>Tomistoma schlegelii</i> ).....	8
2.2 Morfologi kranial buaya Irian .....	8
2.3 Penentuan familia buaya Senyulong .....	9
2.4 DNA mitokondria .....	11
2.5 Skema satu siklus PCR .....	17
2.6 Skema sekuensing DNA metode Sanger .....	19
3.1 Bagan kerangka konseptual.....	21
4.1 Homologi sekuen gen menggunakan BioEdit® dan BLAST .....	30
4.2 Contoh penyejajaran sekuen gen menggunakan <i>software</i> BioEdit® dan pohon filogeni hasil analisa menggunakan <i>software</i> MEGA.....	31
5.1 Isolat DNA total buaya Senyulong Agarose 1% .....	34
5.2 Target sekuen gen COI buaya Senyulong .....	36
5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 1,7% .....	36
5.4 Pohon filogenetik buaya Senyulong menggunakan metode <i>Maximum Likelihood Tree</i> dengan repliasi <i>bootstrap</i> 1000× .....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tahapan Penelitian .....	50
2. Protokol Isolasi DNA .....	51
3. Desain Primer .....	51
4. Perhitungan panjang basa ( <i>basepair</i> ) hasil PCR berdasarkan marker DNA 100bp .....	55
5. Elektropherogram dan format FASTA hasil sekuens buaya Senyulong .....	55
6. Hasil BLAST Sekuens B1, B2, dan B3 .....	57
7. <i>Sequence Alignment</i> .....	57
8. Laik Etik .....	59



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
AE	<i>Eluted buffer</i>
AL	<i>Lysis buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CITES	<i>Convention on International Trade in Species of Wild Fauna and Flora</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EtBr	<i>Etidium bromide</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
g	Gram
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram
Mg	Magnesium
mL	Mililiter
mtDNA	<i>mintochondrial DNA</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>potential of Hydrogen</i>
Pmol	<i>Picomol</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
COI	<i>Cytochrome c oxidase subunit 1</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) merupakan jenis buaya air tawar bermoncong sempit dan panjang yang khas (*longirostrine*). Klasifikasi buaya ini masih dalam perdebatan. Penelitian tingkat molekuler menyatakan bahwa buaya Senyulong yang sebelumnya secara morfologi dikategorikan kedalam keluarga Crocodylidae, ternyata secara genetik memiliki kedekatan yang signifikan dengan buaya Gharial (*Gavialis gangeticus*) dari keluarga Gavialidae (Willis, *et al.*, 2007; Janke, *et al.*, 2005). Dilihat dari ukurannya, buaya ini merupakan salah satu yang terbesar setelah buaya Muara (*Crocodylus porosus*) dengan jantan mencapai panjang 290-404 cm dan berat dengan kisaran 349 Kg. Habitat utama buaya Senyulong meliputi rawa gambut, danau, dan sungai. Persebaran buaya Senyulong saat ini meliputi Sumatra, Kalimantan, dan Jawa (Indonesia) serta Sarawak dan Malaysia Barat. Selain itu, buaya Senyulong secara historis tersebar di Thailand, namun sejak 1970 tidak lagi ditemukan catatannya. Jenis ini juga pernah dikabarkan ada di Sabah, Sulawesi, dan Vietnam, tetapi tidak ada konfirmasi lebih lanjut tentang hal itu (Bezuijen, *et al.*, 2010).

Buaya Senyulong termasuk satwa yang dilindungi menurut Undang-Undang No 5 Tahun 1990 tentang Konservasi Sumber Daya Alam Hayati dan Ekosistemnya serta diatur dalam peraturan pemerintah PP 7/1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa. Secara global, IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) mengkategorikan jenis ini ke dalam *Vulnerable* (rentan terhadap kepunahan) karena populasi di alam diperkirakan kurang dari 2.500-10.000 individu dewasa serta terjadi penurunan populasi sekitar 30% dalam 3 generasi

atau 75 tahun (satu generasi diasumsikan 25 tahun) akibat habitatnya yang terfragmentasi dalam 3 sampai 4 dekade terakhir (IUCN, 2014). Selain itu CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*) menyatakan bahwa buaya Senyulong termasuk kedalam Appendix I yang berarti semua bentuk perdagangan untuk jenis ini dilarang (Bezuijen, *et al.*, 2010).

Berbagai upaya sedang dilakukan terhadap buaya Senyulong untuk meningkatkan populasi baik di alam (*ex-situ*) maupun di lembaga konservasi (*in-situ*) agar terjaga keragaman genetiknya dari ancaman kepunahan. *Captive breeding* (*in-situ*) adalah upaya yang baik untuk menambah jumlah individu satwa yang terancam punah. Upaya ini turut dilakukan oleh salah satu lembaga konservasi di Indonesia yaitu Predator Fun Park (PFP) kota Batu, Jawa Timur. Buaya Senyulong di PFP yang berjumlah 3 ekor dalam jangka panjang akan dikembang biakkan (*breeding*) sehingga memenuhi fungsi lembaga konservasi yaitu menjaga keragaman hayati.

Pemahaman lebih lanjut tentang buaya Senyulong perlu dilakukan demi mendukung upaya pelestariannya. Beberapa penelitian telah dilaksanakan untuk memahami karakteristik buaya Senyulong baik dari aspek makro seperti persebaran dan tingkat populasi di alam (Bezuijen, *et al.*, 2010), maupun secara biomolekuler seperti penentuan tingkat familia dilihat dari sisi genetiknya (Gatesy, *et al.*, 2003). Penelitian secara biomolekuler masih sangat terbatas untuk buaya Senyulong sehingga perlu penelitian lebih lanjut tentang kekerabatan intraspesies (pada spesies yang sama) dan interspesies (pada spesies berbeda). Penelitian kekerabatan intraspesies dan interspesies dapat dilakukan salah satunya dengan melihat sekuen gen di dalam DNA mitokondria (mtDNA) (Densmore and White., 1991).

Penggunaan mtDNA dalam menganalisa kekerabatan sangat lazim dilakukan. Hal ini dikarenakan mtDNA merupakan organel sel yang memiliki laju mutasi yang lebih tinggi (5-10 kali) bila dibandingkan dengan DNA inti, selain itu mtDNA ditransmisikan melalui garis maternal antar generasi tanpa mengalami rekombinasi, sehingga seluruh molekul dapat dianggap sebagai satu unit genetik tunggal yang memiliki banyak alel (DiMauro, 2011). Salah satu gen dari mtDNA yang dapat digunakan sebagai parameter analisa kekerabatan yaitu *Cytochrome c oxidase subunit 1* (COI). Beberapa karakteristik COI yang menjadi pertimbangan dalam penggunaannya yaitu memiliki ukuran yang relatif pendek yaitu sekitar 648 bp, relatif stabil sehingga tidak mudah mengalami perubahan bila dibandingkan dengan gen-gen mitokondria sejenis, variabilitas rendah (1-2%), memiliki jumlah kopi yang banyak sehingga mudah diamplifikasi dibandingkan dengan gen-gen yang berasal dari inti sel (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Selain itu gen COI belum pernah digunakan sebagai gen pembanding kekerabatan pada buaya Senyulong. Gen-gen yang pernah digunakan sebagai pembanding adalah gen D-loop dan 12SrRNA (Kaur and Ong, 2011) serta Cytochrome B (Kaur, *et al.*, 2013). Setelah mengetahui kekerabatan intraspecies pada sampel, maka perlu pula dibandingkan secara interspecies. Sekuen gen interspecies yang dipakai adalah gen COI pada buaya Gharial (*Gavialis gangeticus*) dari familia Gavialidae dan buaya Irian (*Crocodylus novaeguineae*) dari familia Crocodilidae. Hal ini dilakukan untuk membuktikan pendapat Willis, *et al.*, (2007) dan Janke, *et al.*, (2005) bahwa buaya Senyulong jika dilihat secara molekuler lebih dekat dengan familia Gavialidae daripada familia Crocodilidae.



Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kekerabatan buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) yang berada di Predator Fun Park (PFP) kota Batu Jawa Timur secara intraspecies dan interspecies berdasarkan sekuen gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA Mitokondria menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

Bagaimana kekerabatan buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) yang berada di Predator Fun Park (PFP) kota Batu Jawa Timur secara intraspecies dan interspecies berdasarkan sekuen gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* (COI) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah darah 3 ekor buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) masing-masing berusia 5-7 tahun (jantan), 10-12 tahun (betina), dan 15-20 tahun (jantan) yang berada di Predator Fun Park kota Batu, Jawa Timur.
2. Gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* diisolasi dari darah buaya Senyulong menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (50). Pengambilan sampel darah dilakukan melalui *sinus ventro-caudal* dan *sinus post-cranial* (Willis, *et al.*, 2007).
3. Primer gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* didesain menggunakan gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* dari buaya Senyulong (*Tomistoma*



*schlegelii*) dengan kode akses AJ810455 menggunakan program Primer 3plus.

4. Amplifikasi gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* pada mtDNA buaya Senyulong dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (HMD\_F) 5'-GCT TTT CTC CGC TTT CAT CG -3' dan primer *reverse* (HMD\_R) 5'-CCC ATA TAC CCG AAT GGT TC-3'.
5. Metode PCR dilakukan menggunakan mesin *SensoQuest Thermocycler* dengan program: predenaturasi 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 50,3°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama 7 menit.
6. Sekuensing gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* dilakukan dengan metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)* dengan menggunakan primer primer *reverse* (HMD\_R) 5'-CCC ATA TAC CCG AAT GGT TC-3'.
7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen dan kekerabatan antar buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) di Predator Fun Park kota Batu Jawa Timur, buaya Gharial (*Gavialis gangeticus*) *accession number* NC\_008241, dan buaya Irian (*Crocodylus novaeguineae*) *accession number* NC\_015651, menggunakan program BioEdit®, *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA versi 7.026.

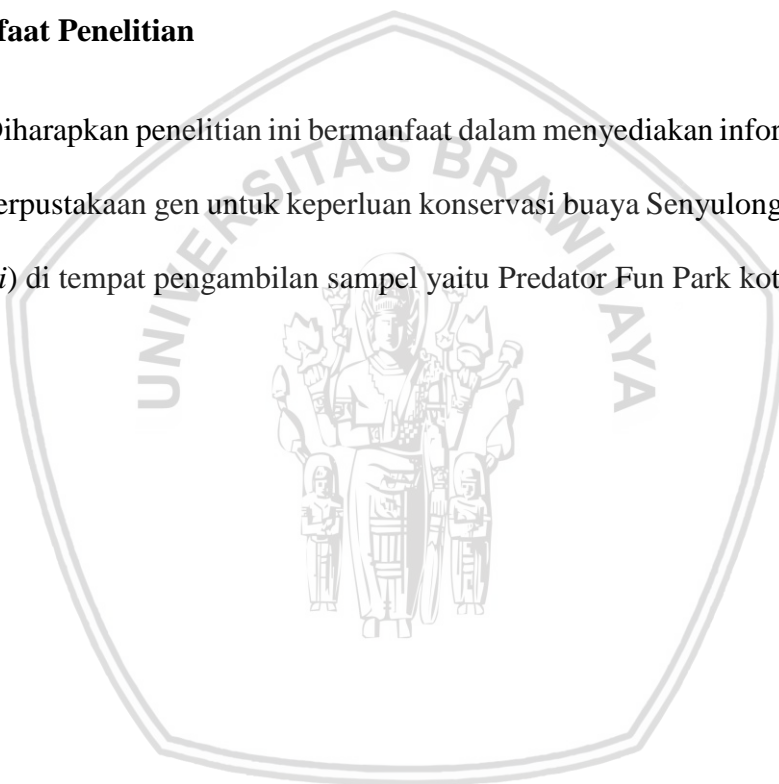
#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

Mengetahui kekerabatan buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) yang berada di Predator Fun Park (PFP) kota Batu Jawa Timur secara intraspecies dan interspecies berdasarkan sekuen gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* (COI) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen untuk keperluan konservasi buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) di tempat pengambilan sampel yaitu Predator Fun Park kota Batu, Jawa Timur.

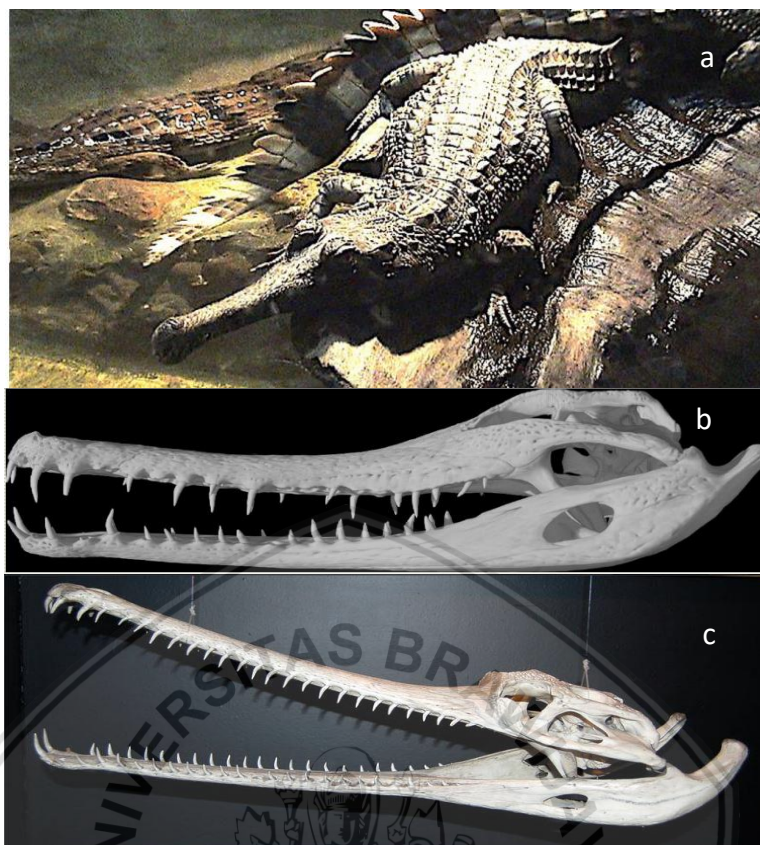


## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Buaya Senyulong

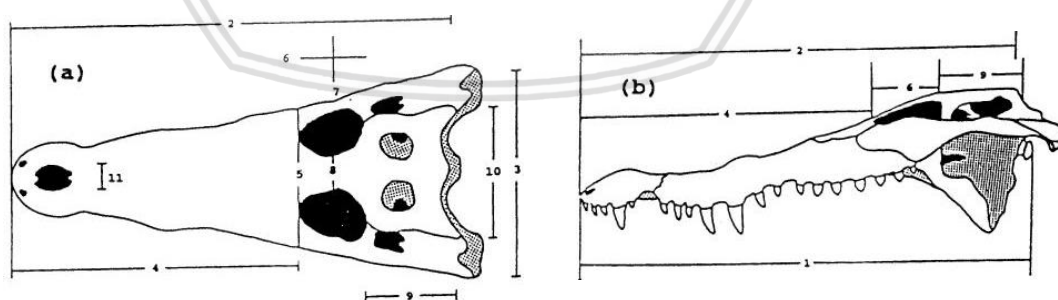
Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) merupakan salah satu dari 23 spesies buaya yang masih bertahan hidup hingga saat ini. Populasi buaya Senyulong terbesar berada di dataran rendah pulau Sumatra dan Kalimantan. Populasi tertinggi di pulau Sumatra yaitu 0.18 dan 0.26 individu/km berada di Sumatra Selatan hingga Jambi (Bezuijen, *et al.*, 2002 dalam Bezuijen, *et al.*, 2010), sedangkan di kalimantan yaitu mencapai 1.4 individu/km terdapat pada Taman Nasional Tanjung Puting (Simpson, 2004 dalam Bezuijen, *et al.*, 2010). Populasi buaya Senyulong yang tersisa di Sarawak dan Malaysia Barat dikonfirmasi pada tahun 2004 dengan keadaan terancam akibat kehilangan habitat asli dan kehadiran manusia pada daerah tersebut. Selain itu Populasi di Brunei Darussalam juga dilaporkan pada tahun 2005 (Stuebing, *et al.*, 2004, 2006 dalam Bezuijen, *et al.*, 2010).

Buaya Senyulong termasuk buaya dengan ukuran terbesar setelah buaya muara (*Crocodylus porosus*) dengan panjang jantan maksimum 290-404 cm dan berat 347 Kg (Erickson, *et al.*, 2012). Secara morfologi buaya Senyulong memiliki kemiripan dengan Crocodylidae, namun ditinjau dari kajian molekuler buaya Senyulong memiliki kedekatan dengan dengan Gavialidae (*Gavialis gangeticus* atau buaya Gharial). Buaya Senyulong dewasa dan perbandingan morfologi kranial buaya Senyulong dengan buaya Gharial dan buaya Irian dapat dilihat pada **Gambar 2.1** dan **Gambar 2.2**.



**Gambar 2.1** Morfologi buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*)

**Keterangan:** a. Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) dewasa (Astani, *et al.*, 2015).  
b. Morfologi kranial buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*)  
c. Morfologi kranial buaya Gharial (*Gavialis gangeticus*) (Museum of Natural History, 2018).

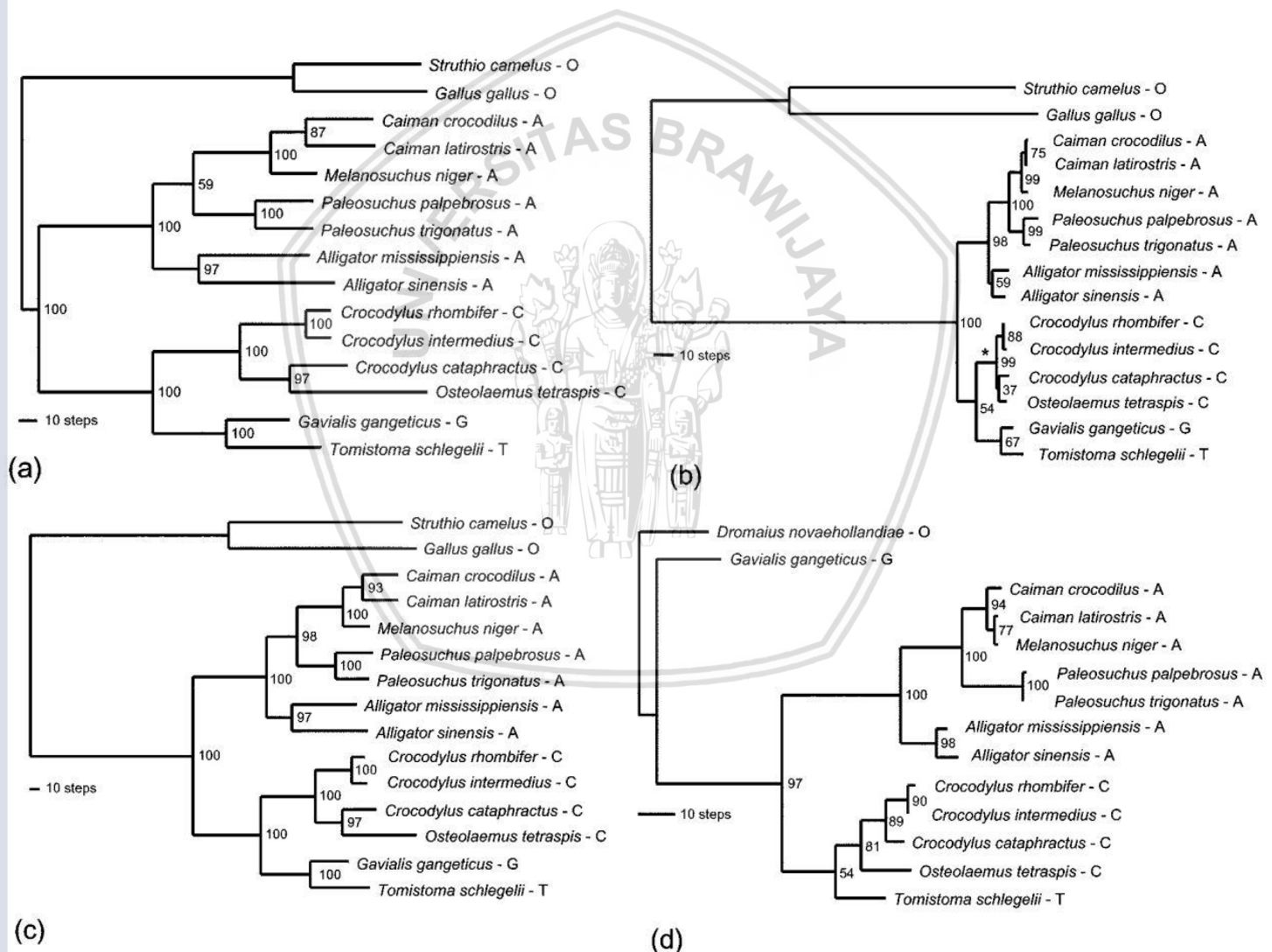


**Gambar 2.2** Morfologi kranial buaya Irian (*Crocodylus novaeguineae*) (Hall and Portier, 1994).

**Keterangan:** a. Tampak dorsal  
b. Tampak lateral



Piras, *et al.* (2010); Gatesy, *et al.* (2003); dan Janke, *et al.* (2005) menjelaskan bahwa masih terjadi perdebatan mengenai penempatan buaya Senyulong dalam filogenetik berdasarkan analisis molekular dan analisis morfologi (**Gambar 2.3**). Analisis molekular menjelaskan bahwa terdapat kedekatan genetik antara buaya Gharial dan buaya Senyulong, namun analisa morfologi menjelaskan bahwa keseluruhan tengkorak buaya Gharial menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan buaya Senyulong dan spesies buaya lainnya.



**Gambar 2.3** Penentuan familia buaya Senyulong berdasarkan mtDNA (a), DNA nukleus (b), kombinasi mtDNA dan DNA nukleus (c), dan secara morfologis (d) (Gatesy, 2003).

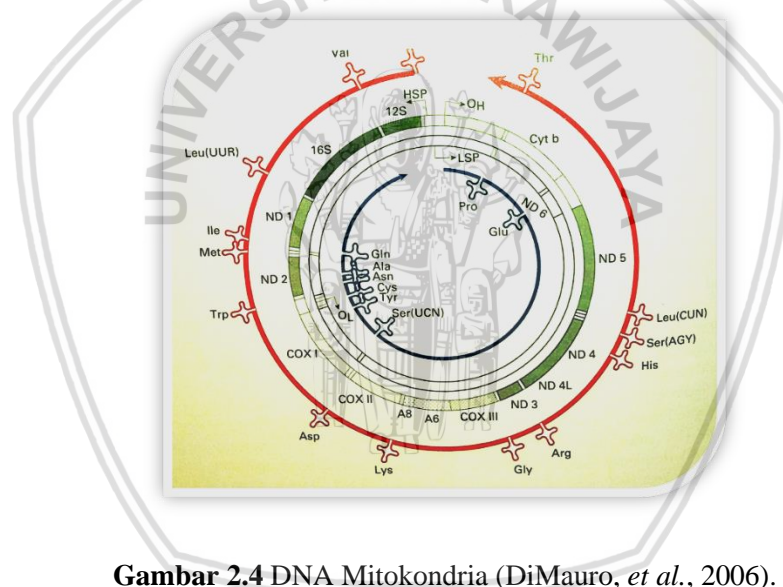
Menurut website ITIS (*Interagency Taxonomic Information System*) (2008), taksonomi buaya Senyulong adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Class : Reptilia  
Ordo : Crocodilia  
Familia : Gavialidae  
Genus : *Tomistoma*  
Species : *Tomistoma schlegelii* (Müller, 1838)

## 2.2 DNA Mitokondria (mtDNA)

Mitokondria memiliki genomnya sendiri yang dikenal dengan DNA mitokondria (mtDNA). Berbeda dengan DNA nukleus, mtDNA merupakan molekul DNA rantai ganda yang berbentuk sirkuler (**Gambar 2.4**), ditransmisikan secara maternal, dan memiliki 16.569 *base pair* (bp) yang terdiri atas 37 gen yaitu gen-gen penyandi rRNA 12S dan 16S, 22 tRNA, dan 13 protein sub unit (*protein-encoding region*). Selain itu mtDNA juga memiliki urutan nukleotida non penyandi (*non-coding region*) yang disebut dengan daerah *Displacement-loop* (D-Loop). Keseluruhan DNA dan D-Loop pada mtDNA tersebar pada dua bagian yaitu *light strand* yang kaya dengan sitosin dan *heavy strand* yang kaya dengan guanin. Penamaan tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa *heavy strand* memiliki berat molekul yang lebih besar dibandingkan dengan *light strand* (DiMauro, *et al.*, 2006). *Light strand* terdiri dari 1 gen penyandi protein (ND 6) dan 8 gen penyandi tRNA (*glutamic acid, proline, serine, cysteine, asparagine, alanine, tyrosine, dan*

*glutaminae*). *Heavy strand* terdiri dari 12 gen penyandi protein (NADH dehydrogenase 1 /ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, COI, COII, COIII, Cytochrome-b, ATPase 6, dan ATPase 8), 2 gen penyandi rRNA (16 S dan 12 S), 1 daerah bukan penyandi (*dloop*), dan 14 gen penyandi tRNA (DiMauro, *et al.*, 2006). Keunggulan mtDNA sebagai bahan penelitian tingkat molekuler yaitu karena mempunyai turunan yang tinggi (*high copy number*), mempunyai jumlah salinan sebesar  $10^4$  - $10^3$  molekul mtDNA /sel somatik. Ukuran mtDNA kecil sehingga dapat dipelajari secara utuh. Genom mtDNA memiliki laju evolusi 5-10 kali lebih cepat dari DNA inti (Sulandari dan Zein, 2009).



**Gambar 2.4** DNA Mitokondria (DiMauro, *et al.*, 2006).

### 2.3 Gen Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI)

*Cytochrome C oxidase* merupakan DNA mitokondria yang terdiri atas Cytochrome c Oxidase Subunit I, II, dan III. Gen COI dipilih menjadi salah satu gen yang sekuennya digunakan dalam *barcode* (Handayani, 2008). Gen ini mempunyai sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam menentukan identitas sebuah spesies hampir semua binatang tingkat tinggi. Alasan dipilihnya COI sebagai kandidat gen analisa kekerabatan adalah panjang gen ini

relatif pendek yaitu sekitar 648 bp, relatif stabil tidak mudah mengalami perubahan bila dibandingkan dengan gen-gen mitokondria sejenis, sangat cocok untuk menentukan identitas sebuah spesies karena mempunyai variabilitas yang rendah (1-2%), bahkan untuk kelompok yang mempunyai kekerabatan sangat dekat hanya mempunyai perbedaan beberapa persen saja. Selain itu gen ini memiliki kopi yang banyak sehingga mudah diamplifikasi (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Selain kelebihan-kelebihan tersebut diatas, diketahui bahwa belum ada penelitian lebih lanjut pada gen COI Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) untuk mengetahui kekerabatannya. Penelitian yang sudah dilakukan pada lokus gen lainnya untuk mengukur kekerabatan pada buaya Senyulong yaitu gen D-loop dan 12SrRNA (Kaur and Alan H.K Ong, 2011) serta Cytochrome B. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa secara molekuler buaya Senyulong lebih dekat dengan Gavialidae daripada Crocodylidae (McAliley, *et al.*, 2006).

#### **2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Munculnya *Polymerase chain reaction* (PCR) secara radikal telah mengubah ilmu biologi sejak pertama kali metode ini ditemukan (Mullis, 1990). Teknik ini banyak digunakan oleh dokter dan peneliti untuk mendiagnosis penyakit, kloning, penentuan urutan gen, dan penyusunan genom. Teknik PCR merupakan proses enzimatik sederhana namun sangat baik yang memungkinkan amplifikasi fragmen DNA (gen) tertentu dari kompleks DNA. PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sumber DNA dari berbagai jaringan dan organisme, termasuk darah, kulit, rambut, air liur, dan mikroba. Sedikit saja fragmen DNA telah dapat menghasilkan cukup banyak salinan yang selanjutnya dapat digunakan untuk analisa. Metode PCR ini menggunakan enzim *Taq Polymerase* untuk



mengamplifikasi fragmen DNA. Hal ini dapat meningkatkan jumlah urutan DNA hingga  $10^6$  -  $10^7$  kali. Dalam satu siklus PCR, akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target (Garibyan dan Avashia, 2013).

Keberhasilan reaksi PCR ditentukan oleh beberapa faktor yaitu, *deoksiribonukleotida triphosphat* (dNTP), oligonukleotida primer, DNA *template* (cetakan), komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi. Oligonukleotida primer (desain primer) memegang peranan penting untuk spesifisitas maksimal dan efisiensi PCR (Sasmito dkk., 2014).

Primer yang baik ditentukan oleh beberapa karakter primer yang baik menurut Sasmito dkk. (2014) antara lain: Panjang primer berkisar 16-28 basa, *Temperature melting* ( $T_m$ ) atau suhu leleh yang tepat untuk disosiasi dalam melepas ikatan, *Temperature annealing* ( $T_a$ ) atau suhu penempelan yang stabil untuk berikatan dengan template DNA, selisih suhu leleh yang rendah dengan suhu maksimum  $5^\circ\text{C}$  agar tidak terjadi penurunan proses amplifikasi, *GC Content* atau jumlah total GC dalam satu untai primer yang berkisar 40% sampai 60%, karena basa G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen sehingga dianggap lebih stabil dalam mengikat templat dibandingkan basa A dan T yang hanya memiliki 2 ikatan hidrogen, dan *GC Clamp* yaitu kondisi ujung 3' pada primer memiliki basa GC agar hibridasi lebih stabil.

#### 2.4.1 Amplifikasi PCR

Menurut Handoyo dan Ari (2000), dasar siklus PCR ada 30-35 siklus meliputi denaturasi ( $93-95^\circ\text{C}$ ) selama 30-90 detik, *Annaeling* ( $37-60^\circ\text{C}$ ) selama 30 detik untuk panjang primer 18-22 basa, dan *Extension* ( $72^\circ\text{C}$ ) dengan waktu tergantung

panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Menurut Widowati (2013), proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama yaitu denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), *annealing* (penempelan primer) dan ekstensi (pemanjangan primer). Proses yang dimulai dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut. Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan editium bromida dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet.

#### 2.4.1.1 Denaturasi Untai Ganda DNA

Denaturasi DNA adalah proses menjadikan DNA untai tunggal dari DNA untai ganda yang dibuka. Denaturasi awal ini dilakukan sebelum enzim taq polymerase ditambahkan. Denaturasi merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Pemisahan untai ganda DNA akan terjadi pada temperature tinggi di awal proses. Temperatur tahap ini berada pada kisaran 92-95°C. Suhu 94°C merupakan pilihan yang standar (Yusuf, 2010).

Menurut Handoyo dan Ari (2000), Suhu denaturasi berbeda tergantung pada panjang fragmen DNA target. Suhu yang terlalu rendah menyebabkan proses belum sempurna, sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang berdampak pada efisiensi PCR. Waktu denaturasi yang terlalu pendek menyebabkan proses belum sempurna, sedangkan waktu denaturasi yang terlalu lama akan merusak template DNA dan sekaligus dapat menurunkan aktivitas polimerase DNA.

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh sekuen target pada untai ganda DNA, jika diperlukan suhu yang lebih tinggi jika sekuen target kaya akan Guanin-Sitosin.

Aktivitas enzim *taq* polimerase akan hilang atau berkurang aktifitasnya akibat suhu denaturasi yang terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama. Waktu paruh aktivitas enzim *taq polymerase* adalah >2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C dan lima menit pada suhu 97,5°C (Sulistyaningsih, 2007).

#### 2.4.1.2 Primer Annealing

Primer *annealing* berkaitan dengan pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi suhu yang digunakan dimulai dengan menghitung *Temperature Melting (T<sub>m</sub>)* dari ikatan pada primer dan DNA template. Cara mudah menghitung bisa menggunakan rumus  $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$ . Suhu *annealing* biasanya 5°C di bawah *T<sub>m</sub>* primer yang sebenarnya. Secara sederhana *T<sub>m</sub>* dipengaruhi oleh DNA template, komponen buffer, dan konsentrasi primer (Sasmito dkk., 2014).

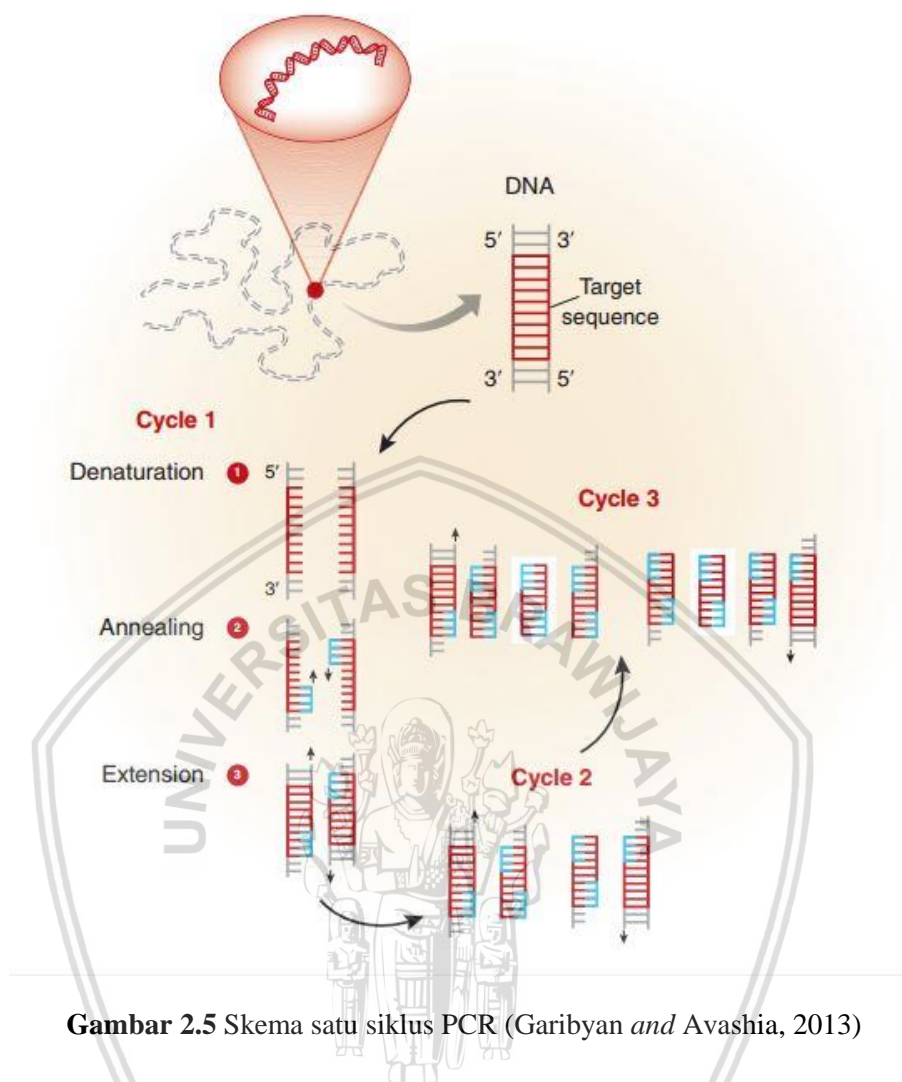
Panjang primer berkaitan dalam penentuan waktu untuk proses *annealing*. Panjang primer 18-22 basa membutuhkan waktu 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa membutuhkan waktu *annealing* 60 detik. Suhu *annealing* secara umum yang digunakan berkisar antara 37-60°C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan *T<sub>m</sub>* primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan  $(T_m - 5)^{\circ}\text{C}$  sampai dengan  $(T_m + 5)^{\circ}\text{C}$ . Keberhasilan suatu proses PCR ditentukan oleh eksperimen dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan serta perlu memperhatikan *mispriming* pada daerah target dan non-target (Handoyo dan Ari, 2000).

#### 2.4.1.3 DNA Polymerase Extension

Proses pemanjangan untai baru DNA terjadi pada proses ini, posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Pada tiap kilobase (1000bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit (Fatchiyah, 2008).

Panjang fragmen DNA menentukan pemilihan waktu ekstensi primer yang akan diamplifikasi. Secara umum untuk mengamplifikasi setiap satu kilo basa DNA diperlukan waktu 30-60 detik. Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum polimerase DNA yang biasa digunakan untuk proses PCR (Handoyo dan Ari, 2000).

Siklus PCR terjadi rangkaian proses denaturasi (1), annealing (2), dan elongasi (3) hingga terhitung siklus pertama selesai (4) (**Gambar 2.5**). Reaksi-reaksi tersebut diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru dan merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi (Yusuf, 2010).



**Gambar 2.5** Skema satu siklus PCR (Garibyan and Avashia, 2013)

## 2.5 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA (Widowati, 2013). DNA dapat diurutkan dengan prosedur kimia dengan menghancurkan molekul DNA yang diberi label pada sebagian pengulangan basis. Panjang fragmen yang berlabel merupakan identifikasi dari posisi dasar tersebut. Metode ini menggambarkan reaksi yang membelah DNA secara khusus pada Guanin, Adenin, Sitosin dan Timin, dan Sitosin itu sendiri. Bila produk dari keempat reaksi ini diproses secara elektroforesis pada gel poliakrilamida untuk melihat berdasarkan ukuran, urutan DNA dapat dibaca dari

pola pita radioaktif. Teknik Sequencing DNA pada metode ini diaplikasikan paling tidak untuk 100 basis dari titik pelabelan. Reagen spesifik purin adalah dimetil sulfat; dan pereaksi spesifik pirimidin adalah hidrazin (Kumar, 2012).

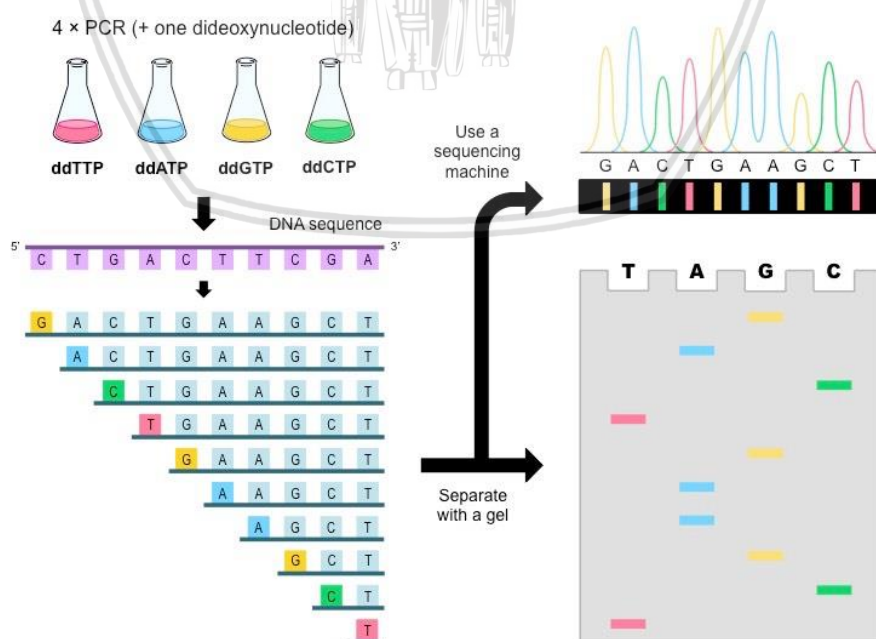
Metode yang umum digunakan adalah metode *Sanger sequencing* (*dideoxy sequencing*) (**Gambar 2.6**). Proses awal metode ini menggunakan satu primer dengan tambahan dideoxynukleotide yang dilabel fluorescent. Warna fluorescent berbeda untuk setiap basa, oleh karena itu urutan basa suatu DNA yang tidak diketahui bisa ditentukan (Widowati, 2013).

Prinsip utama *Sanger sequencing* (*dideoxy sequencing*) adalah penggunaan trifosfat dideoxynucleotide (ddNTPs) sebagai terminator rantai DNA (**Gambar 2.5**). Metode penghentian pemanjangan untai rantai DNA membutuhkan templat DNA beruntai tunggal, primer DNA, DNA polimerase, radioaktif atau fluoresen dengan label nukleotida, dan nukleotida termodifikasi. Sampel DNA dibagi menjadi empat urutan reaksi terpisah yang mengandung keempat standar deoxynucleotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) dan DNA polimerase. Setiap reaksi hanya ditambahkan satu dari empat dideoxynucleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) yang merupakan rantai yang menghentikan nukleotida. Fragmen DNA yang baru disintesis dan diberi label dan dipisahkan oleh ukuran dengan elektroforesis gel pada gel *polyacrylamide-urea denaturing* dengan masing-masing dari empat reaksi berjalan di salah satu dari empat jalur individu (jalur A, T, G, C), pita DNA saat itu divisualisasikan dengan autoradiografi atau sinar UV, dan urutan DNA dapat dibaca secara langsung pada film sinar-X atau gambar gel. Sebuah band gelap di jalur menunjukkan fragmen DNA yang merupakan hasil dari penghentian rantai setelah penggabungan dideoxynucleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau



ddTTP). Posisi relatif dari pita yang berbeda di antara keempat jalur tersebut kemudian digunakan dan dibaca (dari bawah ke atas) sesuai urutan DNA (Gatc-biotec.com, 2017).

Variasi teknis sekuensing pemutusan rantai termasuk pemberian tag dengan nukleotida mengandung fosfor radioaktif untuk pelabelan, atau menggunakan primer yang diberi label pada ujung 5' dengan pewarna fluoresen. Sekuensing pewarna primer memudahkan pembacaan dalam sistem optik agar lebih cepat, mudah dianalisis, dan lebih ekonomis. Metode penghentian rantai sangat mempermudah sekuensing DNA. Keterbatasan pengikatan primer yang tidak spesifik terhadap DNA mempengaruhi pembacaan urutan DNA secara akurat dan struktur sekunder DNA (Gatc-biotec.com, 2017). Panjang sekuen yang dihasilkan berkisar antara 1.000–1.200 pasang basa (bp) dan tidak mampu mencapai lebih dari 2.000 bp (Obenrader, 2003).



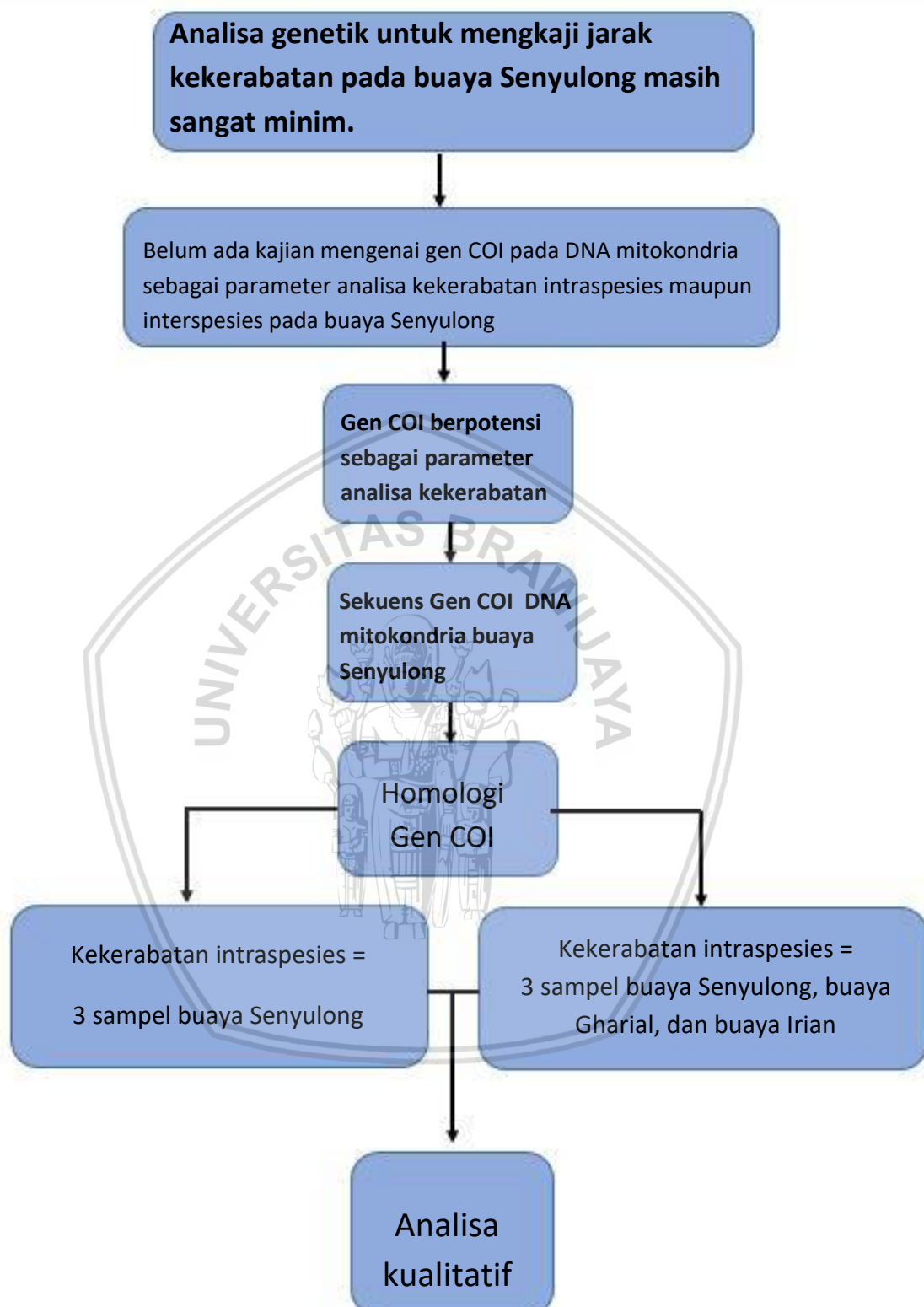
**Gambar 2.6** Skema metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)*(onlinebiologynotes.com, 2018)

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual

Analisa kekerabatan pada buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) secara genetik merupakan kajian yang perlu ditinjau lebih lanjut mengingat kurangnya informasi tentang hal ini. Gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA mitokondria masih belum dikaji sebagai parameter analisa kekerabatan buaya Senyulong baik intraspecies maupun interspecies. Perlu kajian kualitas pada gen COI karena memiliki potensi yang baik. Potensi itu dapat dilihat dari letaknya yang berada di DNA mitokondria, diturunkan secara maternal, secara historis memiliki sifat yang stabil, dan variabilitasnya yang rendah (1-2%). Homologi dan analisa secara kualitatif dilakukan pada Sekuen gen COI yang didapatkan (menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* /PCR dan pembacaan menggunakan metode *Sanger sequencing*) untuk melihat kemampuannya dalam mengukur jarak kekerabatan buaya Senyulong secara intraspecies dan interspecies. Kekerabatan intraspecies dilihat dengan membandingkan sekuen gen COI pada 3 sampel senyulong Predator Fun Park kota Batu Jawa Timur dan satu sekuen gen COI buaya Senyulong dari *gen bank* NCBI dengan kode akses AJ810455. Kekerabatan interspecies dilakukan dengan membandingkan sekuen gen COI pada 3 sampel buaya Senyulong, sekuen buaya Senyulong dari *gen bank* NCBI dengan kode akses AJ810455, buaya Gharial (*Gavialis gangeticus*) dengan kode akses NC\_008241, dan buaya Irian (*Crocodylus novaeguineae*) dengan kode akses NC\_015651. Bagan kerangka konseptual dapat diamati pada **Gambar 3.1**.





**Gambar 3.1** Bagan Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis Penelitian ini adalah analisa sekuen gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA mitokondria buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) dapat memperlihatkan jarak genetik intraspesies dan interspesies.



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel darah buaya Senyulong dilakukan di Predator Fun Park kota Batu, Jawa Timur. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) untuk persiapan bahan dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemesanan primer, Laboratorium ADD (*Animal diagnostic disease*) untuk pelaksanaan PCR, dan Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Ibrahim Malang untuk Uji kuantitas DNA. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2017- Maret 2018.

### 4.2 Pemilihan Sampel Buaya Senyulong

Buaya Senyulong yang digunakan berasal dari Predator Fun Park kota Batu, Jawa Timur. Tidak diketahui hutan asal buaya tersebut (Sumatra, Kalimantan, atau Malaysia). Identitas sampel dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Buaya Senyulong**

No	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Asal	Simbol
1	Petruk	15-20	Jantan	-	B1
2	Jerry	10-12	Betina	-	B2
3	Aqua	5-7	Jantan	-	B3

### 4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *disposable syringe*, sarung tangan, masker, *ice box*, kertas label, tabung EDTA, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, *AE-Nano200 Nucleic Acid Analyzer*<sup>®</sup>, *Mupid-Exu Electrophoresis*, kamera dan tisu.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu darah 3 ekor buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) masing-masing berusia 5-7 tahun (Jantan), 10-12 tahun (betina), dan 15-20 tahun (jantan), *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (50), ddH<sub>2</sub>O, primer *forward* (HMD\_F) 5'-GCT TTT CTC CGC TTT CAT CG -3' dan primer *reverse* (HMD\_R) 5'-CCC ATA TAC CCG AAT GGT TC-3', PCR *mix* (Promega *GoTaq*<sup>®</sup> *Green Master Mix* 2×), marker DNA 100 bp dan 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE 1×), *agarose* 1% dan 1,7 %, *loading buffer*, etanol absolut, alkohol 70%, aluminium foil, dan larutan etidium bromida (EtBr).

### 4.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama kali yaitu pemilihan dan pengambilan sampel yang dilakukan di Predator Fun Park Kota Bati, Jawa Timur. Didapatkan 3 ekor sampel darah buaya Senyulong (dua Jantan dan satu betina) yang diambil melalui sinus *post-cranial* dan sinus *caudo-ventral*. Sampel darah tersebut selanjutnya melalui tahap isolasi DNA serta dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif pada isolat yang didapat. Setelah isolat dinilai baik maka

dilakukan tahap berikutnya yaitu amplifikasi gen target secara invitro dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang telah didesain. Produk PCR yang didapat selanjutnya diuji secara kualitatif dan dilakukan sekuensing DNA target sehingga dapat dilakukan analisa deskriptif pada hasil sekuensing tersebut. Bagan tahapan penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi kasus yang dianalisa secara deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Data diperoleh dari sekuen gen COI untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan intraspecies antara sampel buaya Senyulong, dan interspecies antara sampel buaya Senyulong dengan buaya Gharial, dan buaya Irian. Sebanyak 3 sampel darah yang diuji merupakan darah dari buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) sebanyak 2 cc setiap individu. Dilakukan isolasi DNA pada sampel darah tersebut kemudian diukur konsentrasinya dan kemurniannya menggunakan nanospektrofotometer, dan ukuran fragmen DNA menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1%. Setelah itu, sampel DNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* dan primer *reverse*. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel *agarose* 1,7 %. Produk PCR kemudian disekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan program BioEdit®, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.026 serta dianalisa secara deskriptif.

## 4.6 Prosedur Kerja

### 4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Buaya Senyulong

Pengambilan darah pada buaya dilakukan setelah prosedur *handling* dan *restrain* dilakukan. Lokasi pengambilan sampel darah dilakukan pada *sinus post-cranial* (tepat di caudodorsal os occipital) dan *sinus caudo-ventral* (pada pangkal ekor bagian ventral) (Willis, *et al.*, 2007). Volume sampel darah yang diambil masing-masing sebanyak 2cc dari 3 individu buaya Senyulong. Sampel darah dimasukkan ke dalam EDTA *vacutainer tube* dan di label sesuai nama individu buaya Senyulong. Sampel yang telah berada pada EDTA *vacutainer tube* kemudian disimpan di dalam *ice box*.

### 4.6.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel darah buaya Senyulong menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (50) mengikuti protokol isolasi DNA dari darah (**Lampiran 2**). Terdapat 3 langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein serta pemurnian DNA.

### 4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

#### 4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin *AE-Nano200 Nucleic Acid Analyzer<sup>®</sup>*. Blanko yang digunakan adalah ddH<sub>2</sub>O. ddH<sub>2</sub>O ditetaskan langsung diatas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1µL, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup)



ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 1  $\mu$ L sampel diteteskan diatas pedestal submicroliter cell yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor (Nanodrop Technologies, 2007).

#### 4.6.3.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis *agarose* 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen COI. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Cetakan *agarose* dibersihkan dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel *agarose* 1% (0,15 g) hingga mendidih atau *agarose* larut. Menurut Fatchiyah dkk., (2008) campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 $\mu$ l dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Campuran *agarose*, TBE 1x dan EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat baru kemudian diambil sisir secara perlahan. Gel dengan sumuran yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* Mupid-Exu *Electrophoresis*. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan kedalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel. *Marker* (DNA *ladder*) dan *loading dye* (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu sumuran. Campuran larutan *loading dye* dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan kedalam sumur selanjutnya. *Chamber* dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit.

Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan gel diangkat dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil didokumentasikan dan diekspose dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisis (Fatchiyah dkk, 2008).

#### 4.6.4 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genebank* : AJ810455.1. Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data AJ810455.1 : 4884-6467 *Tomistoma schlegelii partial mitochondrion* (**Lampiran 3**). Sepasang sekuens primer yang didapatkan adalah primer *forward* (HMD\_F) 5'-GCT TTT CTC CGC TTT CAT CG -3' (*start*: 336; *length* : 20 bp; *Tm* : 54,5°C; GC : 50,0%) dan primer *reverse* (HMD\_R) 5'-CCC ATA TAC CCG AAT GGT TC-3' (*start*: 796; *length* : 20 bp; *Tm* : 52,7°C; GC : 50 %) dengan target produk PCR 479 bp.

#### 4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari buaya Senyulong diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (HMD\_F) dan *reverse* (HMD\_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 µL DNA, 1 µL primer *forward* 10pmol, 1 µL primer *reverse* 10pmol, 5 µL PCR mix dan 2 µL ddH<sub>2</sub>O ke dalam mikrotube 200 µL (PCR *tube*). Tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian annealing pada suhu 50,3°C selama 30 detik. Extension pada suhu 72°C

selama 1 menit dan post extension pada 72<sup>0</sup>C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

#### 4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA yaitu untuk menghitung kemurnian produk PCR gen COI dari darah buaya Senyulong. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Sebanyak 3 $\mu$ L Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel *agarose* 1,7% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Kemudian didokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transiluminator.

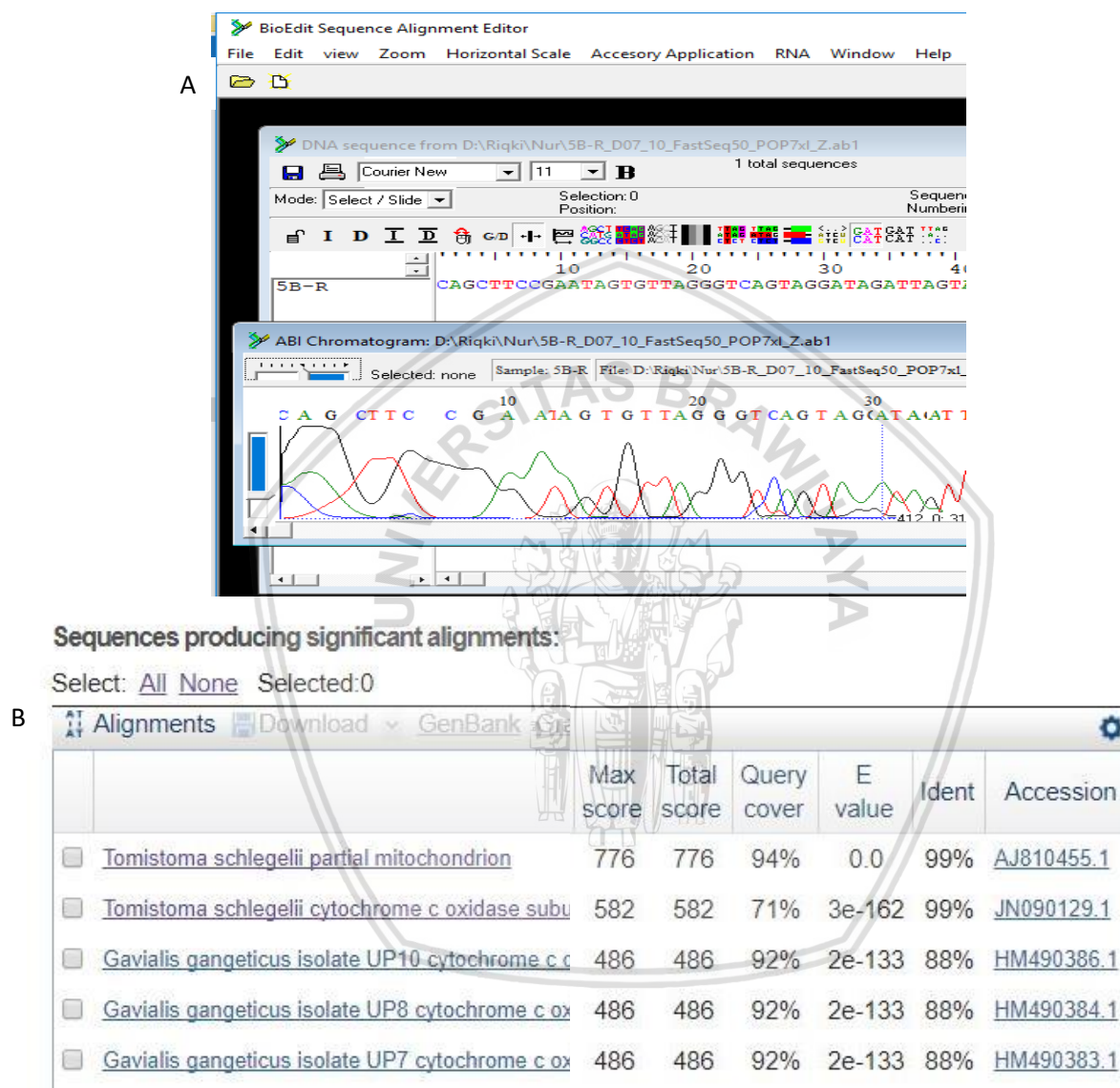
#### 4.6.7 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen COI dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer HMR\_F dan HMD\_R 10 pmol untuk melihat sekuen gen COI sepanjang 479 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50ng/ $\mu$ L untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

#### 4.6.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan antara 3 sampel buaya Senyulong di Predator Fun Park kota Batu Jawa Timur, satu sekuen gen COI

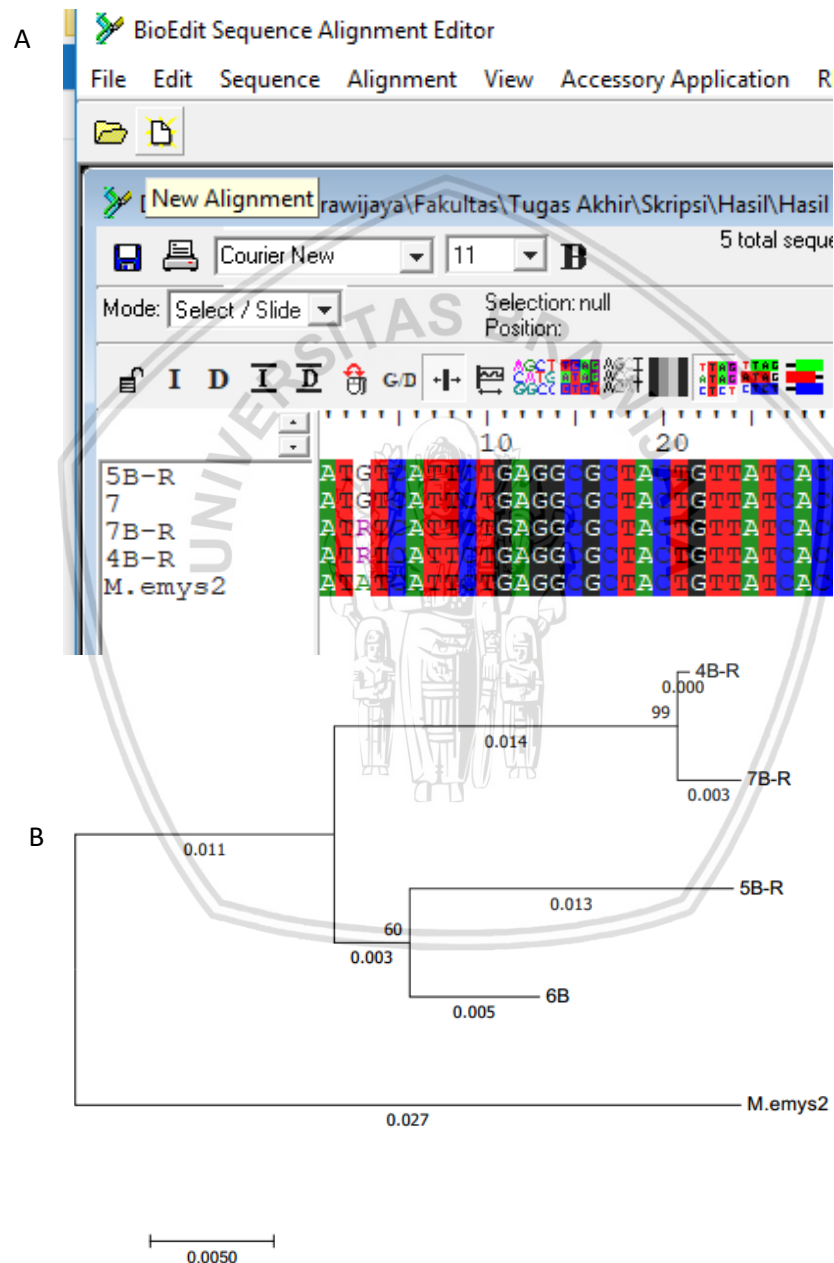
buaya Senyulong dari *gen bank* NCBI, buaya Gharial, dan buaya Irian yang juga dari *gen bank* NCBI melalui homologi gen dengan menggunakan *software* BioEdit® dan BLAST NCBI (dapat dilihat pada **Gambar 4.1**).



**Gambar 4.1** Homologi sekuen gen menggunakan BioEdit® (A) dan BLAST (B) (NCBI, 2018)

Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuens DNA dengan membandingkan antara sampel B1, B2, dan B3 dengan database NCBI *Genebank* : AJ810455.1 (buaya Senyulong), NC\_008241 (buaya Gharial), dan NC\_015651 (buaya Irian). Penyejajaran sekuens menggunakan algoritma *ClustalW multiple*

*alignment*. Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.026 dengan metode *bootstrapped Maximum Likelihood Tree* (ML) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis program MEGA tersebut akan diperoleh matriks jarak genetik persamaan basa nukleotida (dapat dilihat pada **Gambar 4.2**).



**Gambar 4.2** Contoh penyejajaran sekuens gen menggunakan *software* BioEdit® (A) dan pohon filogeni hasil analisa menggunakan *software* MEGA versi 7.026 (B) (dokumentasi pribadi, 2018)

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Isolasi DNA, Amplifikasi, dan Sekuensing Gen COI Buaya Senyulong

Analisa agen COI (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) pada penelitian ini melalui beberapa tahapan yaitu isolasi, amplifikasi dan sekuensing. Keberhasilan masing-masing tahapan berpengaruh pada proses selanjutnya. Beberapa poin penting pada proses isolasi dan amplifikasi dapat dilihat dari uji kualitatif dan kuantitatif yaitu konsentrasi, kemurnian dan spesifisitas gen yang dihasilkan. Jika uji kualitatif dan kuantitatif pada tahap isolasi dan amplifikasi menunjukkan hasil yang kurang baik maka berpotensi menurunkan kualitas sekuensing sehingga hasil analisa memiliki validitas yang kurang baik. Salah satu parameter analisa dengan validitas baik yaitu dilihat dari hasil BLAST dan nilai *bootstrap*. Hasil dinyatakan memiliki validitas yang baik jika memiliki BLAST dengan nilai *query cover* dan *ident* diatas 90% serta *bootstrap* dengan nilai diatas 70% (Lemey, 2009).

#### 5.1.1 Isolasi DNA Buaya Senyulong

Isolasi DNA dari sampel buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) berupa *wholeblood* dilakukan dengan menggunakan *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (50) sesuai dengan protokol. Isolat DNA yang dihasilkan kemudian diuji secara kuantitatif menggunakan *AE-Nano200 Nucleic Acid Analyzer*<sup>®</sup> (*nanophotometer*) yang hasilnya dapat dilihat pada **Tabel 5.1** Selain itu isolat DNA diuji secara kualitatif menggunakan Elektroforesis *agarose* 1% yang dapat dilihat pada **Gambar 5.1**



**Tabel 5.1** Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA Buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*)

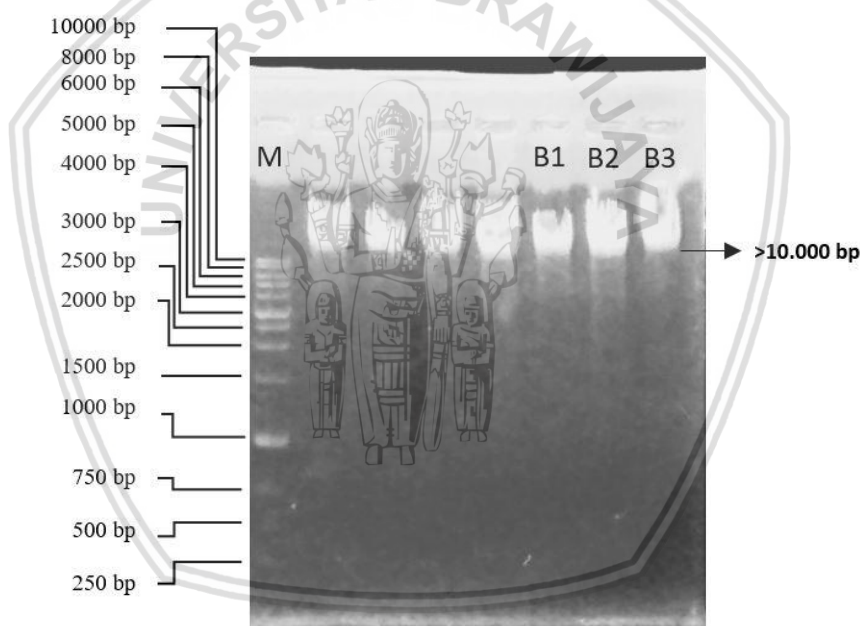
Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (nm) (Absorbansi 260/280)
<b>B1</b>	103,44 ng/ $\mu$ L	1,40
<b>B2</b>	167,01 ng/ $\mu$ L	1,57
<b>B3</b>	107,55 ng/ $\mu$ L	1,22

**Keterangan :** B1=Petruk, B2=Jerry, B3=Aqua

Hasil isolasi DNA dikatakan baik apabila didapatkan DNA yang murni dan utuh. Pengukuran konsentrasi DNA maupun penentuan kemurniannya merupakan suatu tahap yang sangat diperlukan dari serangkaian proses isolasi DNA. Konsentrasi DNA dapat dihitung secara akurat melalui penyerapan spektrofotometrik sinar ultraviolet (Siswanto, dkk., 2016). New England Biolabs (2018) merekomendasikan bahwa konsentrasi yang digunakan pada *running* PCR adalah 1pg-10 ng/50 $\mu$ L untuk DNA target yang relatif pendek. Berdasarkan hal tersebut, isolat DNA B1 (103,44 ng/ $\mu$ L=5.172 ng/50 $\mu$ L), B2 (167,01ng/ $\mu$ L=8.35 ng/50 $\mu$ L), dan B3 (107,55 ng/ $\mu$ L=5.377 ng/50 $\mu$ L) memiliki konsentrasi yang baik untuk proses PCR karena lebih dari 10 ng/50 $\mu$ L. Metode yang sering digunakan untuk menentukan kemurnian DNA yaitu menggunakan rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ). Rasio dibawah 1,8 nm menunjukkan indikasi kontaminasi protein, sedangkan nilai yang lebih tinggi dari 2,0 nm menunjukkan kontaminasi RNA (Santella, 2006). Hasil uji kuantitatif isolat DNA sampel B1, B2, dan B3 pada tabel menunjukkan rasio absorbansi dibawah 1.8nm sehingga terindikasi adanya kontaminsi protein. Hal ini sesuai dengan Syahputra (2016) yang menyatakan bahwa tingkat kemurnian isolat DNA hasil isolasi metode kit memiliki

resiko kontaminasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan metode konvensional.

Kontaminasi protein (contohnya *casein hydrolysate*) telah terbukti menghambat proses PCR. Beberapa hal yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal ini yaitu dengan penambahan proteinase K pada saat isolasi (Demeke, 2010). Pada penelitian yang telah berlangsung tidak dilakukan penambahan proteinase K sebagai penghancur protein kontaminan. Proses PCR tetap dilakukan tanpa perlakuan khusus dengan harapan konsentrasi DNA yang tinggi dapat memperkecil kemungkinan terjadinya hambatan pada PCR.



**Gambar 5.1** Isolat DNA total buaya Senyulong Agarose 1%

**Keterangan:** M= marke 1 kb, B1=Petruk, B2=Jerry, B3=Aqua

Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA yang terang dan berada diatas marker dengan pita DNA 10.000 bp. Hal tersebut menunjukkan konsentrasi isolat yang baik serta memiliki ukuran pada kisaran 16-18 kb (DNA mitokondria) dan 20-50 kb (DNA inti) (Meganathan, *et al.*, 2011).

### 5.1.2 Amplifikasi Gen COI Buaya Senyulong

Amplifikasi gen COI pada buaya Senyulong menggunakan primer yang didesain dari *genebank* NCBI *reference sequence* AJ810455.1 dan memiliki panjang target sekuens 479 bp (**Tabel 5.2**). Program PCR yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 5.3**. Target sekuens gen COI menggunakan primer tersebut dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.

**Tabel 5.2** Urutan Oligonukleotida Primer Gen COI Buaya Senyulong

Primer	Urutan Oligo Nukleotida	Lokasi Penempelan (basa ke)
<i>Forward</i> (HMD_F)	5'-GCTTTTCTCCGCTTTCATCG-3'	336-355
<i>Reverse</i> (HMD_R)	5'-CCCATATACCCGAATGGTTC-3'	796-815

Keterangan : Target sekuensing yaitu *reverse-forward* (815bp-336bp = 479 bp)

**Tabel 5.3** Program PCR untuk Amplifikasi gen COI Buaya Senyulong

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	3 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	50,3°C
Ekstensi	1 menit	72°C
<i>Post</i> Ekstensi	7 menit	72°C

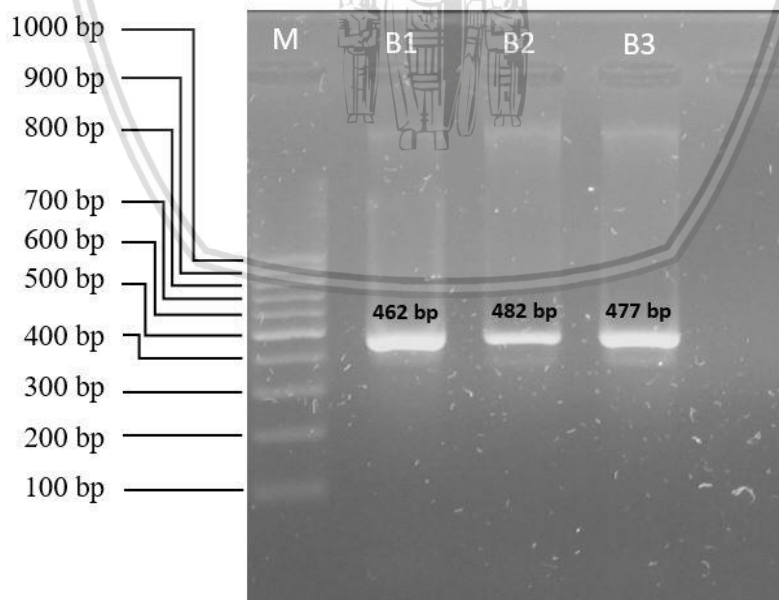
```

1  gtgaacatta atcgtgact tttctccacc aaccacaaag acatcggcac cctttacttt
61  atcttcggag cctgagcggg aatagttgga acagccctaa gcctccttat tcgcacagaa
121 ctaagtcaac cgggacccct cataggagac gaccaaactc ataagtgtat tgttaccgca
181 catgccttta ttatgatttt cttcatagta atacctatta taattggggg atttgaaac
241 tgactactac cactaatgat tggcgacccc gacatagcat tcccacgaat aaataatata
301 agcttctgat tactcccacc atcattcacc ttactgcttt tctccgcttt catcgaaact
361 ggggctggaa cgggatgaac agtctatccg gccctagcag gaaacctagc ccacgccgga
421 ccctccgtag acttaaccat tttctccctt cactcgcag gagtatcttc aatcttaggg
481 gcaattaact ttattaccac agccattaac ataaaacccc cagcaatata acaataccaa
541 acacctcttt ttgtatgatc tgtattaatt acagctgtgc ttctctactc ttccctacca
601 gtattagctg caggaatcac cactactctc accgatcgaa acctaaatac aaccttcttt
661 gaccctcagc gcggcggaga ccctatccta tatcaacatc tcttctgatt cttcgccac
721 ccagaagttt atatccttat cctccaggga ttggaataa tctcccatgt agtcaccttc
781 tactcaggaa aaaaagaacc attcgggtat atgggaatag tgtgagccat aatatcaatt
841 ggcttcctgg gtttcattgt ttgagctcat cacatattta cagtaggaat agacgttgat
901 acccgagcat attttacttc cgctacaata gtaatcgcta tccccaccgg agtaaaagta
961 ttcagctggc tagcaacaat ctacggagga attataaact gacaagcccc catactctga
1021 gcattaggct ttattttctt atttacagta ggaggactaa caggaatcgt cctagccaac

```

**Gambar 5.2** Target sekuens gen COI buaya Senyulong (*genebank NCBI reference sequence AJ810455.1*). **Kuning:** Primer forward, **Abu-abu:** Region of interest, dan **Hijau:** Primer reverse.

Proses PCR selama kurang lebih 90 menit menghasilkan produk yang selanjutnya melalui uji kualitatif elektroforesis agarose 1,7%. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada **Gambar 5.3**.



**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 1,7%  
**Keterangan :** M= marker 100 bp , **B1**=Petruk, **B2**=Jerry, **B3**=Aqua.

Hasil uji kualitatif tersebut menggambarkan keberhasilan proses PCR dengan produk yang dihasilkannya. Produk PCR B1 menempati 462 bp, B2= 482 bp, dan B3= 477 bp berdasarkan marker (**Lampiran 4**). Hal ini menunjukkan kesesuaian produk PCR dengan target berdasarkan desain primer yaitu berukuran 479 bp dan siap untuk disekuensing.

### 5.1.3 Sekuensing Gen COI Buaya Senyulong

Semua produk PCR (B1, B2, dan B3) selanjutnya melalui tahap sekuensing dengan metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)* menggunakan *Automatic DNA Sequencer (ABI 370A DNA sequencer)*. Pembacaan sekuens menggunakan *software BioEdit®* pada komputer sistem operasi Windows 10. Hasil sequencing DNA berupa grafik elektroferogram dan data berupa urutan basa hasil sekuensing dalam format FASTA (**Lampiran 5**). Hasil tersebut kemudian dilakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) guna mengkalkulasi similaritas sekuens dengan *database* di NCBI. Hasil BLAST kemudian menjadi patokan atas keberhasilan atau kesesuaian sequencing (panjang sekuen yang dapat dibandingkan) (Madden, 2003). Sekuens menunjukkan kualitas baik dengan panjang basa yang dapat dibandingkan (*Query cover*) yaitu 94% (B1), 97% (B2), dan 98% (B3), serta memiliki presentasi identitas (*ident*) diatas 98% (**Tabel 5.4** dan **Lampiran 6**). Hal ini sesuai dengan Wiley (2011), bahwa sekuens dengan *Query cover* dan *ident* pada kisaran 95% memiliki kualitas yang baik untuk dilakukan analisa.



**Tabel 5.4** Query coverage dan *ident* sampel terhadap *genbank* AJ810455

Sampel	Panjang Basa (bp)	Query coverage	Ident
B1 (Petruk)	454	94%	99%
B2 (Jerry)	443	97%	98%
B3 (Aqua)	454	98%	99%

## 5.2. Analisa Sekuen Gen COI Buaya Senyulong

### 5.2.1. Mutasi Genetik

Hasil sekuensing dari ketiga sampel buaya Senyulong adalah sekitar 443 bp sampai dengan 454 bp dan panjang basa sekuensing untuk analisa yaitu 442 bp setelah melalui penyejajaran. Analisa data menggunakan *software* BioEdit® (**Lampiran 7**) menunjukkan bahwa terdapat 143 situs bervariasi (mengalami substitusi basa/mutasi) (**Tabel 5.5**).

**Tabel 5.5** Karakteristik Mutasi pada Analisa Sekuens Gen COI Buaya Senyulong

Sampel	Jenis Mutasi	Jumlah	Total
B1 Petruk	Transisi	5	8
	Transversi	2	
	Inseri	1	
B2 Jerry	Transisi	5	6
	Transversi	1	
B3 Aqua	Transisi	5	6
	Transversi	1	
<i>G. gangeticus</i>	Transisi	41	56
	Transversi	15	
<i>C. novaeguineae</i>	Transisi	41	67
	Transversi	26	
			143

Terdapat 4 jenis mutasi pada proses duplikasi DNA, yaitu mutasi yang menyebabkan tergantinya purin (A,G) dengan purin atau pirimidin (C,T) dengan pirimidin (translasi), penggantian basa dari purin ke pirimidin atau sebaliknya (transversi), penambahan basa nukleotida (insersi), dan pengurangan basa nukleotida (delesi) (Lemey, 2009). Berdasarkan **Tabel 5.5** dapat disimpulkan



bahwa terjadi substitusi basa atau mutasi yang didominasi oleh tipe transisi. Mutasi tipe transisi yang terjadi pada sampel B1 Petruk yaitu sebanyak 63%, B2 Jerry 83%, dan B3 Aqua 83%. Selain itu, tipe mutasi transisi juga mendominasi sampel pembanding yaitu *G.gangeticus* sebanyak 73% dan *C. novaeguineae* sebanyak 61%. Selebihnya hanya terdapat 17-39% tipe mutasi transversi pada sampel B1 Petruk, B2 Jerry, dan B3 Aqua, serta terdapat satu tipe mutasi insersi (12,5%) pada sampel B1 Petruk. Tidak terdapat tipe mutasi delesi pada analisa sekuens tersebut. Hal ini sesuai dengan Habert *et al.*, (2003) bahwa COI memiliki kelebihan dalam analisa karakteristik genetik karena sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuen gennya serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari). Lynch and Jarrel (1993) dalam Herlina (2013) berpendapat bahwa perubahan basa pada *triple* kodon gen COI tidak disertai dengan perubahan asam amino (*silent mutation*). Sifat mutasi tersebut menguntungkan proses analisa gen COI karena resiko perubahan protein akibat mutasi dapat dikesampingkan.

#### **5.2.2. Gen COI dalam Analisa Kekerabatan Buaya Senyulong Intraspecies dan Interspecies**

Analisa filogenetik berkaitan erat dengan peristiwa evolusi biologis. Evolusi adalah proses gradual suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks. Keturunan suatu organisme akan memiliki perbedaan dengan nenek moyangnya sebab mengalami proses evolusi. Selain mempelajari tentang evolusi, analisa filogenetik dapat digunakan untuk mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antar populasi dengan menghitung jarak genetik dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen berdasarkan urutan DNA. Perhitungan jarak genetik menggunakan metode *Pairwise Distance*

pada penelitian ini ditunjukkan pada **Tabel 5.6**. Analisis filogenetik biasanya juga direpresentasikan sebagai sistem percabangan seperti diagram pohon yang dikenal sebagai pohon filogenetik (Brinkman *and* Leipe, 2001). Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan *software* MEGA versi 7.026. Metode yang digunakan untuk mendesain pohon filigenetik adalah *Maximum Likelihood Tree* dengan repliasi *bootstrap* 1000× yang hasilnya ditunjukkan pada **Gambar 5.4**.

**Tabel 5.6** Persentase Data Perhitungan *Pairwise Distance* (*Genetic distance*/Jarak genetik)

	1	2	3	4	5	6
<b>1. <i>T. schlegelii</i></b>						
<b>2. B1 Petruk</b>	0.020					
<b>3. B2 Jerry</b>	0.016	0.011				
<b>4. B3 Aqua</b>	0.014	0.011	0.007			
<b>5. <i>G. gangeticus</i></b>	0.130	0.143	0.136	0.139		
<b>6. <i>C. novaegineae</i></b>	0.157	0.164	0.157	0.157	0.166	

Keterangan :



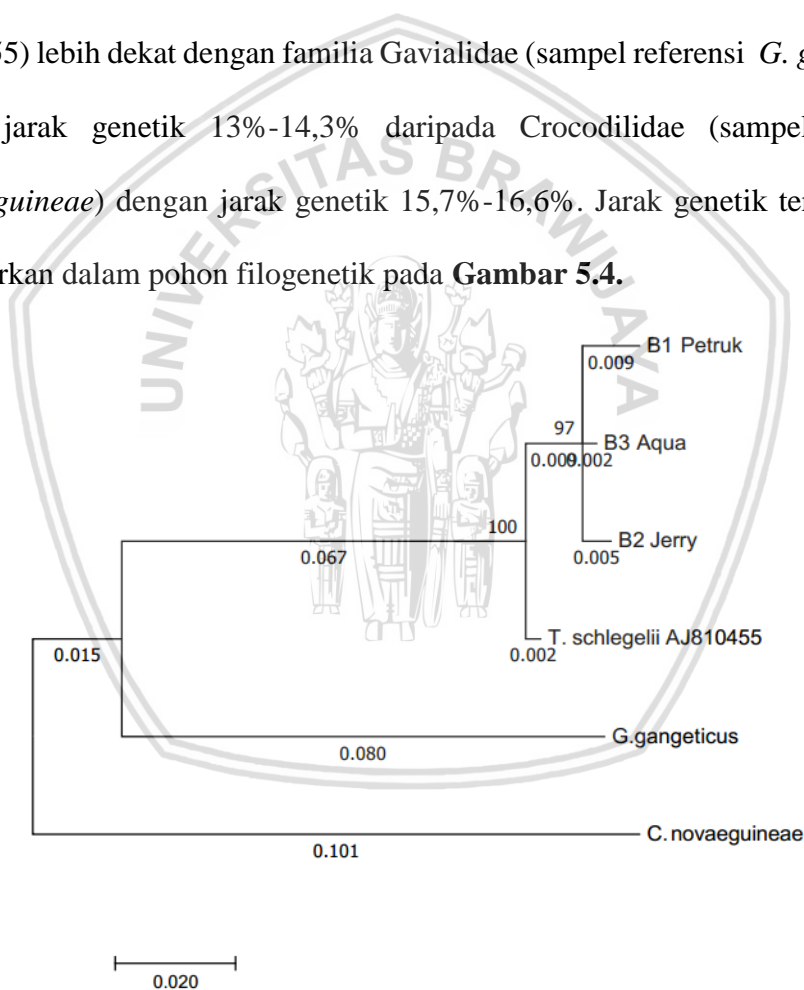
= Intraspecies

= Interspecies

Hasil *Pairwise Distance* pada **Tabel 5.6** memperlihatkan jarak genetik secara intraspecies maupun interspecies. Jarak genetik yang diperlihatkan oleh sampel B1 Petruk, B2 Jerry, dan B3 Aqua terhadap sampel referensi *T. schlegelii* memiliki nilai  $\leq 2\%$ . Secara rinci dapat dilihat pula jarak genetik terdekat pada sampel B2 Jerry dan B3 Aqua dengan nilai 0,7%. Avise (2000) dalam Habert (2003) menyebutkan bahwa jarak genetik intraspecies pada DNA mitokondria sangat jarang sekali bernilai lebih dari 2%. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa sampel B1 Petruk, B2 Jerry, dan B3 Aqua memiliki hubungan intraspecies terhadap sampel referensi *T.schlegelii* AJ810455. Hubungan interspecies dapat terlihat jika sampel B1 petruk, B2 Jerry, B3 Aqua, dan *T. schlegelii* AJ810455 dibandingkan dengan sampel referensi *G. gangeticus*

*accession number* NC\_008241 yang bernilai 13% sampai 14,3%, serta dapat pula terlihat jika dibandingkan dengan sampel referensi *C. novaeguineae* *accession number* NC\_015651 yaitu bernilai 15,7% sampai 16,4%.

Berdasarkan keterangan diatas jelas bahwa gen COI pada buaya Senyulong dapat digunakan sebagai parameter analisa kekerabatan baik intraspecies maupun interspecies. Gen COI pada hasil *Pairwise Distance* **Tabel 5.6** juga memperlihatkan bahwa buaya Senyulong (sampel B1 Petruk, B2 Jerry, B3 Aqua, dan *T. schlegelii* AJ810455) lebih dekat dengan familia Gavialidae (sampel referensi *G. gangeticus*) dengan jarak genetik 13%-14,3% daripada Crocodilidae (sampel referensi *C.novaeguineae*) dengan jarak genetik 15,7%-16,6%. Jarak genetik tersebut juga digambarkan dalam pohon filogenetik pada **Gambar 5.4**.



**Gambar 5.4** Pohon filogenetik buaya Senyulong menggunakan metode *Maximum Likelihood Tree* dengan repliasi *bootstrap* 1000×

*Maximum Likelihood Tree* merupakan metode yang umum digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik berbasis metode jarak (*distance method*). Kombinasi *Maximum Likelihood Tree* dengan analisis *bootstrap* dapat menjadi pilihan untuk mengevaluasi pohon filogenetik berbasis jarak. *Maximum Likelihood Tree* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberi estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen (Dharmayanti, 2011).

*Bootstrap* adalah prosedur statistika yang melakukan sampling dari sebuah populasi yang dikerjakan dengan cara resampling dari sampel. Metode *bootstrap* merupakan *resample* data yang secara acak memilih kolom vertikal dari sekuen untuk menghasilkan penyejajaran baru dengan panjang yang sama. Masing masing kolom digunakan lebih dari satu kali dan beberapa kolom mungkin tidak digunakan pada semua penyejajaran yang baru. Sebagai contoh validitas penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik dapat diuji dengan *resampled* dari kolom dalam *multiple sequence alignment* untuk membentuk beberapa penyejajaran baru (Dharmayanti, 2011).

Pohon filogenetik pada Gambar 5.4 menunjukkan kualitas yang baik karena memiliki nilai *bootstrap* diatas 97%. Hal ini menandakan kestabilan pohon filogeni dalam pembentukan kelompok (*clade*). Sesuai dengan Osawa *et,al.*, (2004) dalam Wirdateti (2016), bahwa nilai *bootstrap* dikatakan stabil jika nilainya berada di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilainya berada di bawah 70%.

Berdasarkan pohon filogeni tersebut diketahui bahwa ketiga sampel buaya Senyulong (B1 petruk, B2 Jerry, dan B3 Aqua) berada dalam satu *clade* (kelompok) dengan jarak genetik 0,011=1,1% (B1 Petruk terhadap B3 Aqua), 0,014=1,4% (B1

Petruk terhadap B2 Jerry), dan 0,007=0,7% (B3 Aqua terhadap B2 Jerry). Jika sampel buaya Senyulong (B1 petruk, B2 Jerry, dan B3 Aqua) dibandingkan dengan referensi *T. schlegelii* AJ810455 maka masih dapat dikatakan *ingroup* (grup yang sama) karena memiliki *common ancestor* (nenek moyang yang sama). Tampak pula kedudukan *sistergroup* jika sampel buaya Senyulong dan sampel referensi *T. schlegelii* AJ810455 dibandingkan dengan sampel referensi *G.gangeticus* dengan jarak geneti berkisar 0,149-0,165. Sampel referensi *C.novaeguineae* dapat dikatakan *outgroup* (grup berbeda) karena memiliki jarak yang cukup jauh dan memiliki *common ancestor* yang berbeda dengan kelima sampel lainnya. Pohon filogeni ini sesuai dengan Tabel 5.6 yang juga menunjukkan bahwa buaya Senyulong (sampel B1 petruk, B2 Jerry, B3 Aqua, dan *T. schlegelii* AJ810455) cenderung lebih dekat dengan buaya Gharial (sampel referensi *G. Gangeticus*) dari familia Gavialidae dan memiliki jarak genetik yang lebih jauh dengan buaya Irian (sampel *C. novaeguineae*) dari familia Crocodylidae. Hal ini sesuai dengan Willis, *et al.*, (2007) dan Janke, *et al.*, (2005) yang menyatakan bahwa buaya Senyulong jika dilihat secara molekuler lebih dekat dengan familia Gavialidae daripada familia Crocodylidae.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Kekerabatan buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) yang berada di Predator Fun Park (PFP) kota Batu Jawa Timur berhasil dideskripsikan berdasarkan Gen COI (*Cytochrome C oxidase* subunit 1) secara intraspecies maupun interspecies. Jarak genetik intraspecies sampel buaya Senyulong yang dibandingkan dengan sekuen gen COI buaya Senyulong *database* NCBI bernilai sama atau kurang dari 2%. Jarak genetik interspecies yang dibandingkan dengan buaya Gharial (*Gavialis gangeticus*) familia Gavialidae bernilai 13% sampai 14,3%, sedangkan jika dibandingkan dengan buaya Irian (*Crocodylus novaeguineae*) familia Crocodylidae bernilai 15,7% sampai 16,4%.

### 6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai gen COI pada buaya Senyulong (*Tomistoma schlegelii*) mengenai standar keragaman genetik (*genetic diversity*) maupun jarak genetik (*genetic distance*) mengingat minimnya informasi mengenai hal tersebut.



## DAFTAR PUSTAKA

- Astani, Behnam Safiei., Alan Han Kiat Ong., Alireza Valdiani., Soon Guan Tan., Christina Seok Yong Yien., Fatemeh Ahmady., Noorjahan Banu Alitheen., Wei Lun Ng., and Taranjeet Kuar. 2015. Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): Comparative potentials of SSRs versus ISSR. *Gene*-40625.pP. 10. ELSEVIER
- Bezuijen , Mark R., Bruce M. Shwedick., Ralf Sommerland., Colin Stevenson., Robert B. Steubing. 2010. *Tomistoma Tomistoma schlegelii. Status Survey and Conservation Action Plan*. Pp. 133-138.
- Brinkman, F. And D. Leipe. 2001. *Phylogenetic Analysis. In : Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Gene and Protein*. Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (Eds). John Wiley & Sons.
- Densmore, Llewellyn III and P. Scott White. 1991. The systematics and Evolution of the Crocodilia as Suggested by Restriction Endonuclease Analysis of Mitochondrial and Nuclear Ribosomal DNA. *Copeia*. Pp. 602-615.
- Dharmayanti, N. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA* 21 (1): 1-10.
- DiMauro, Salvatore., Michio Hirano., Eric A Scon. 2006. *Mitochondrial medicine*. Informa Healthcare, an imprint of Informa UK.
- Erickson, Gregory M., Paul M. Gignac., Scott J. Steppan., A. Kristopher Lappin., Kent A. Vliet., John D. Brueggen., Brian D. Inouye., David Kledzik., and Grahame J. W. Webb. 2012. Insights into the Ecology and Evolutionary Success of Crocodilians Revealed through Bite-Force and Tooth-Pressure Experimentation. *Cocodillian Feeding Biomechanics and Evolution*. Vol. 7, 1-12. Plose One.
- Fatchiyah. 2008. Buku Praktis: *Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. UB. Malang
- Garibyan, Lilit., dan Nadhi Avashia. 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 133.
- Onlinebiologynotes. 2018. Sanger Method of Gene Sequencing. [http:// www.onlinebiologynotes.com/sangers-method-gene-sequencing/](http://www.onlinebiologynotes.com/sangers-method-gene-sequencing/). [6 Mei 2018]

- Gatesy, John., George Amato., Mark Norell., Rob Desalle., and Cheryl hayashi. 2003. Combined Support for Wholesale Taxic Atavism in Gavialine Crocodilians. *Society of Systematic Biologists*. Vol. 52 Pp. 403-422
- Habert, Paul D. N., Sujeevan Ratnasingham., and Jeremy R. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society*. Vol. 270
- Handayani. 2008. *Analisis DNA Mitokondria Badak Sumatera Dalam Konservasi Genetik* [Skripsi]. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Handoyo, D dan Ari Rudiretna. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. Vol.9, No 1.
- Herlina. 2013. *Karakteristik gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) pada kerang bulu (Anadara antiquulata Linn.) asal Perairan Panimbangan dan Bojonegara, Provins Banten* [Skripsi]. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. IPB.
- IUCN. 2014. *Tomistoma schlegelii, False Gharial*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- ITIS. 2008. *Tomistoma schlegelii*. [https://www.itis.gov/servlet/ topic=TSN&search\\_value=202208&print\\_version=PRT&source=to\\_print#null](https://www.itis.gov/servlet/topic=TSN&search_value=202208&print_version=PRT&source=to_print#null). [4 Februari 2018]
- Janke Axel., Anette Gullberg., Sandrine Hughes., Ramesh K. Aggarwal., Ulfur Arnason. 2005. *Mitogenomic Analyses Place the Gharial (Gavialis gangeticus) on the Crocodile Tree and Provide Pre-K/T Divergence Times for Most Crocodilians*. *Journal of Molecular Evolution*, 61:620-626.
- Kaur, Taranjeet., Alan H. K. Ong. 2011. Heteroplasmy, Length, and Sequence Characterization of the Control Region in *Tomistoma schlegelii*. *Biochemistry and Genetics*, 49:562-575.
- Kaur, Taranjeet., Jeffrine Rovie Ryan Japning., Mohamad Shahbudin Sabki., Irvan Sidik., Lee Kim Chong., Alan H. K. Ong. 2012. Genetic Diversity of *Tomistoma schlegelii* Inferred from mtDNA Markers. 51:275-295.
- Kumar, Bharti Rajendra. 2012. *DNA Sequencing -Method and Aplication: DNA Representation*. Croatia. InTech.

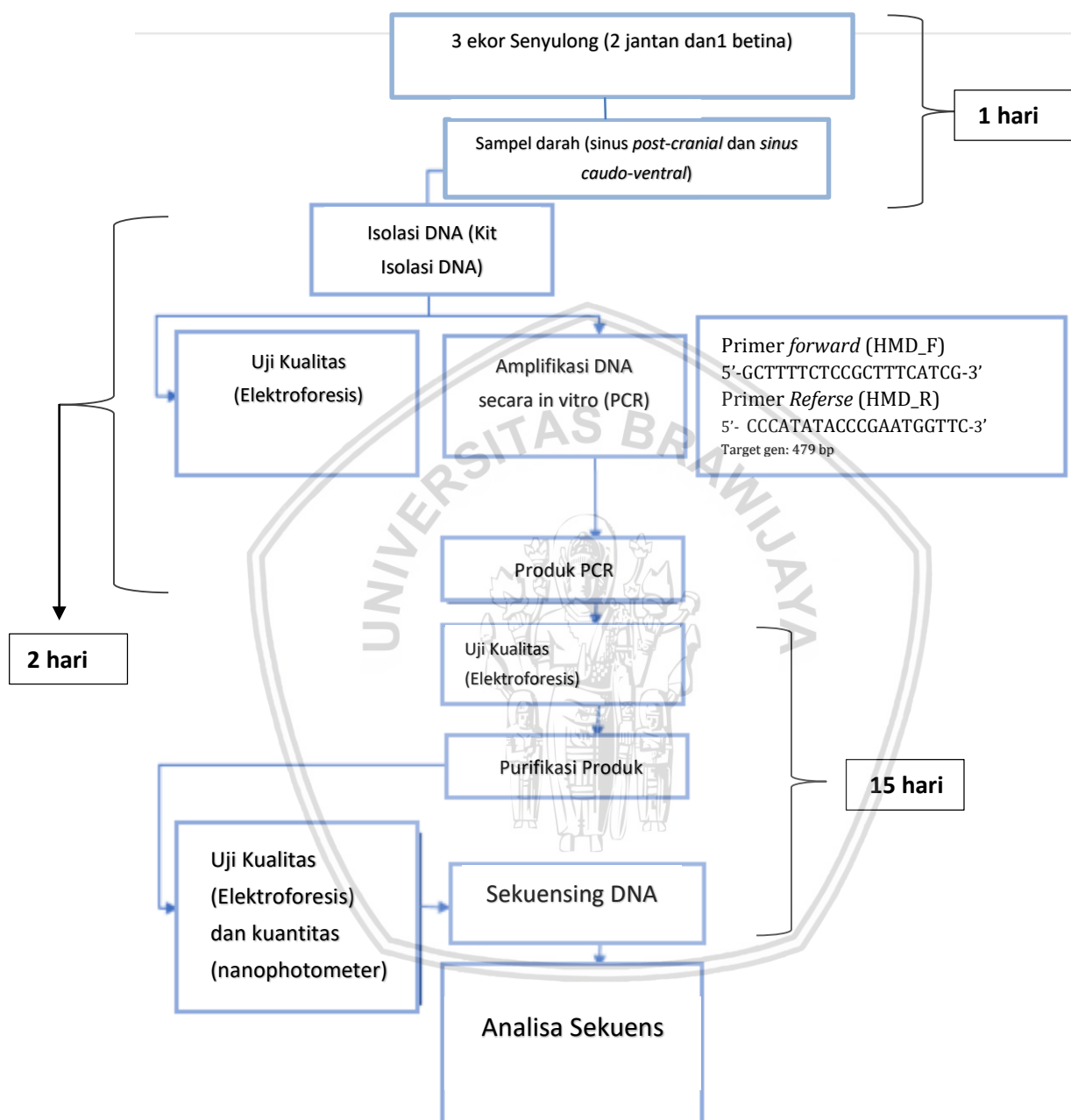
- Lemey, Phillipe., Marco Salemi., and Anne-Mieke Vandemme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press., United Kingdom.
- Madden, Tom. 2003. *The BLAST Sequence Analysis Tool : The NCBI handbook*. The National Laboratory Medicine. USA.
- McAliley, L. Rex., Ray E. Willis., David A. Ray., P. Scott White., Christopher A. Brochu., Llewellyn D. Densmore III. 2006. Are crocodiles really monophyletic?—Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39:16-23.
- Meganathan, P.R., Bhawana Dubey., Mark A. Batzer., David A. Ray., Ikramul Haque. 2011. Complete Mitochondrial Genome Sequence of Three *Crocodylus* species and Their Comparison within the Order Crocodylia. *Gene*. 478:35-43.
- Mullis, KL. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase. *Sci Am*. 262:56-51, 64-5.
- Museum of Natural History. 2018. *Gavialis gangeticus*. <http://www.muzeum-przyrodnicze.uni.wroc.pl/en/index.php?go=exhibition-vertebrate-skeleton>. [28 Februari 2018]
- Nanodrop Technologies, Inc. 2007. *260/280 and 260/230 Ratios Nanodrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc
- NCBI. 2018. *Blast*. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&QUERY=AJ810455.1&DATABASE=nr&MEGABLAST=on&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&LINK\\_LOC=nucore&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&QUERY=AJ810455.1&DATABASE=nr&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&LINK_LOC=nucore&PAGE_TYPE=BlastSearch). [4 Januari 2018]
- New England Biolabs. 2018. *PCR Troubleshooting Guide*. <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>. [11 April 2018]
- Obenrader, Sarah. 2003. *The Sanger Method*. Davidson College. North Carolina.
- Santella, Regina M. 2006. Approach to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 15:9
- Sasmito, Dinda Eling K., Rahadian Kurniawan dan Izzati Muhimmah. 2014. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)* V 2014.

- Siswanto, Jo Edy., Tiara Berlian., Evira Putricahya., Lidya V. Panggalo., dan Luluk Yuniani. 2016. Isolasi DNA pada Sampel Darah Tepi dan *Swab Buccal* Pada Bayi Penderita ROP: Perbandingan Hasil Uji Konsentrasi dan Indeks Kemurnian. *Sari Pediatri*. 18 :4.
- Sulandari, S., dan M.S.A. Zein. 2009. Analisis D-Loop Mitokondria untuk memposisikan Ayam Hutan Merah dalam Domestikasi Ayam di Indonesia. *Media Peternakan*, 32:31-39.
- Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. *J. Biomedis*, Vol 1
- Widowati, Esti. 2013. *Desain Primer Sitokrom b Sebagai Salah Satu Komponen PCR untuk Deteksi DNA Babi*. Yogyakarta: LP Universitas Kalijaga.
- Wiley, E. O. And Bruce S. Lieberman. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practise of Pylogenetic Systematics*; Second Edition. Wiley-Blackwell., USA.
- Willis, Ray E., L. Rex McAliley., Erika D. Neeley., Llewellyn D. Densmore III. 2007. Evidence for Placing the Fals Gharial (*Tomistoma schlegelii*) into the Family Gavialidae: Inferences from Nuclear Gene Sequences. *Molecular Phylogeny and Evolution*. 43:787-794.
- Wirdateti., Eka indriana., dan Handayani. 2016. Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (*Nycticebus spp*) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies. *Jurnal Biologi Indonesia*. 12 (1) : 119-128.
- Yusuf, Zuhriana. 2010. Polymerase Chain Reaction. *Saintek Vol 5 No.6*. Gorontalo. Universitas Negeri Gorontalo.
- Zein, M. Syamsul Arifin, dan Dewi Malia Prawiradilaga. 2013. DNA Barcode Fauna Indonesia. Kencana Prenamedia Group., Jakarta. 15-16.

# LAMPIRAN



# Lampiran 1. Tahapan Penelitian





## Lampiran 2. Protokol Isolasi DNA

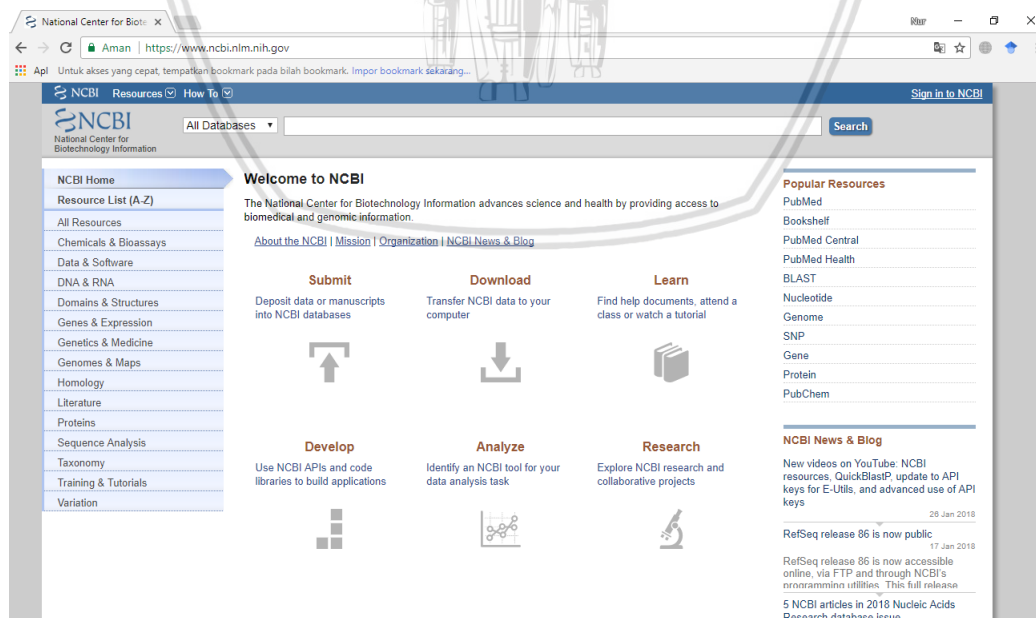
### Qiagen protease

- Ditambahkan 20  $\mu$ L ke dalam microcentrifuge tube 1,5 mL
- Dimasukkan sampel sebanyak 20  $\mu$ L
- Ditambahkan 20  $\mu$ L Qiagen protease
- Ditambahkan PBS hingga 300  $\mu$ L
- Ditambahkan AL sebanyak 200  $\mu$ L, kemudian divortex 15 detik dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 56°C
- Ditambahkan 200  $\mu$ L etanol (96-100%), kemudian divortex 15 detik
- Dituangkan ke spin collum yang terpasang pada *collection tube*
- Disentrifus selama 1 menit kecepatan 8000 rpm, kemudian pindahkan pada *collection tube* yang baru
- Ditambahkan 500  $\mu$ L AW1, kemudian disentrifus selama 1 menit kecepatan 8000 rpm dan dipindahkan ke *collection tube* baru
- Ditambahkan 500  $\mu$ L AW2, kemudian disentrifus selama 6 menit kecepatan 13.500 rpm dan dituang ke dalam microtube
- Ditambahkan 100  $\mu$ L AE dan tunggu selama 1 menit pada suhu ruang
- Disentrifus selama 1 menit kecepatan 8000 rpm

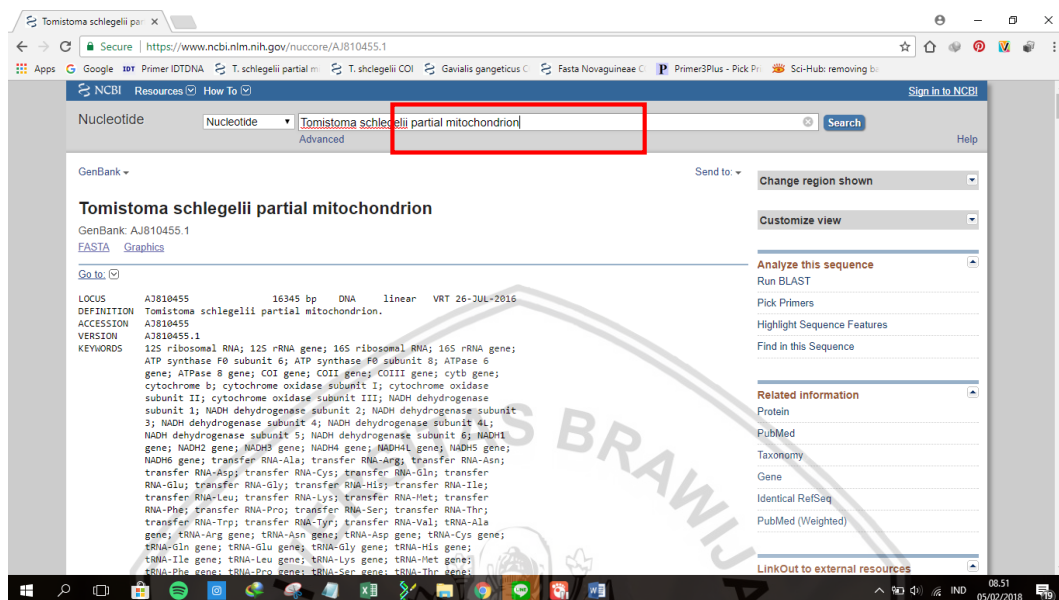
### Hasil

## Lampiran 3. Desain Primer

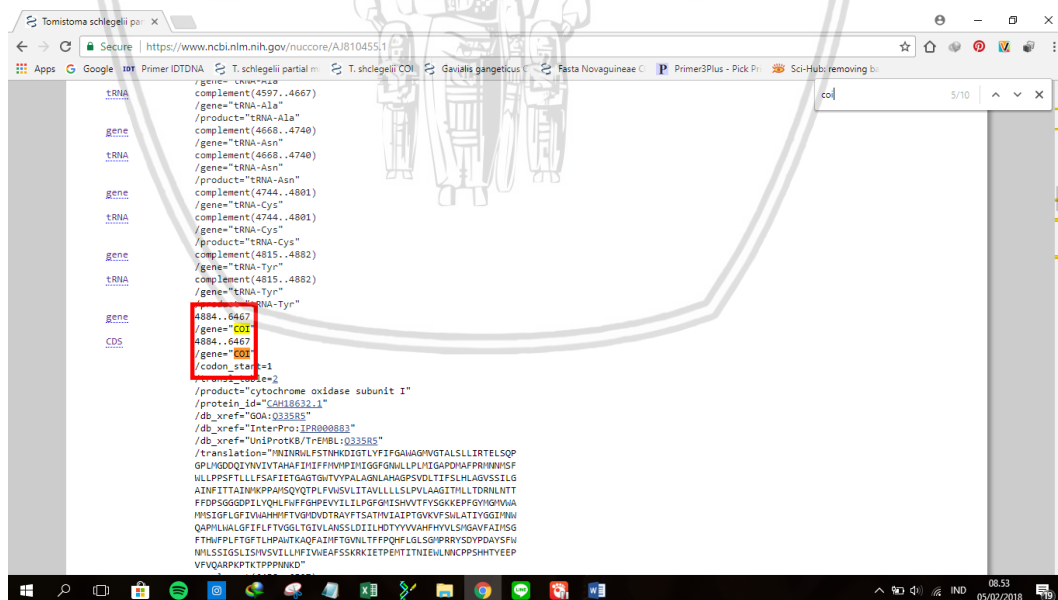
- a. Dibuka Halaman NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sehingga muncul tampilan seperti berikut :



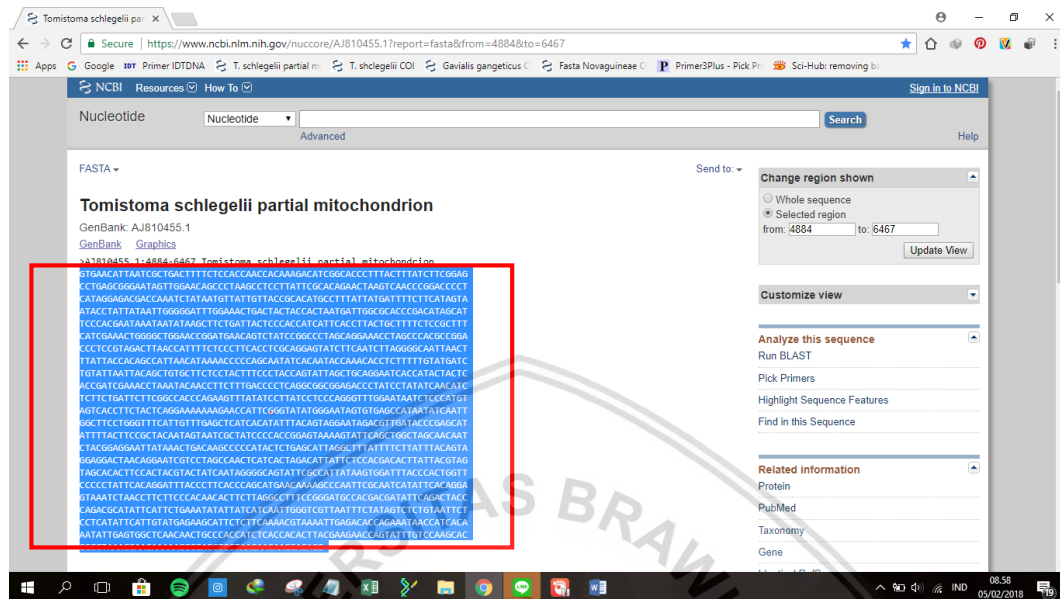
- b. Dipilih ‘Nucleotide’ kemudian diisikan kata kunci pada pencarian (*Tomistoma schlegelii* partial mitochondrion). Klik search hingga muncul tampilan sebagai berikut:



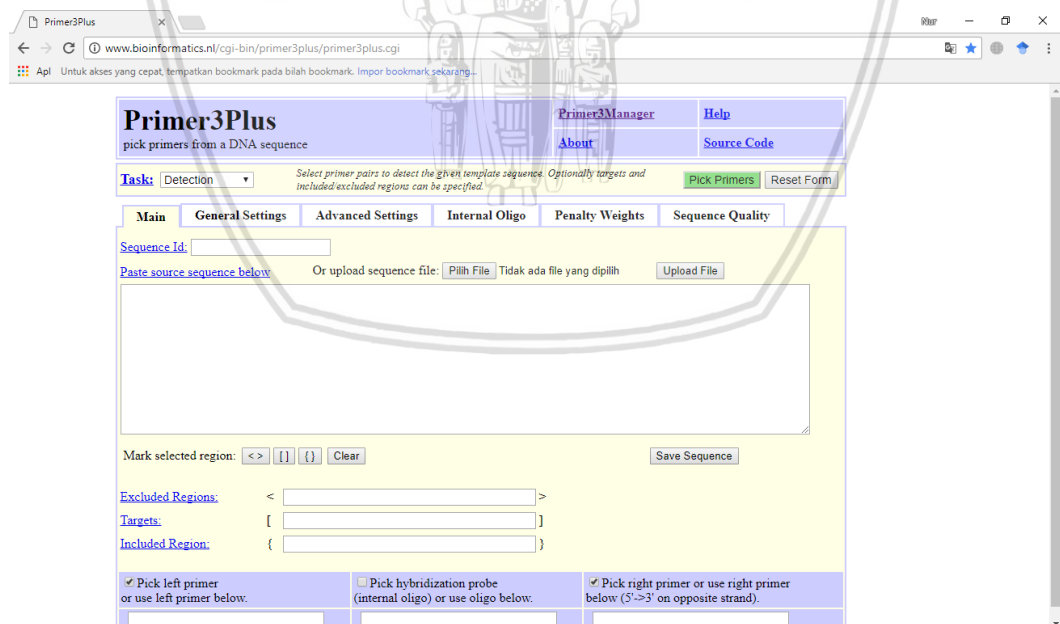
- c. Lakukan pencarian (ctrl+F) “COI”



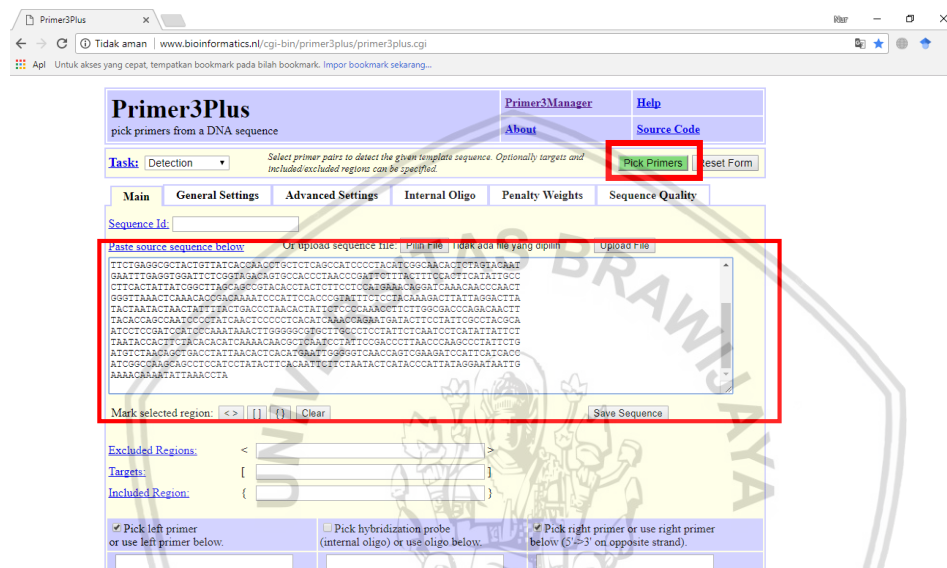
- d. Klik kanan *link* COI yang tersedia lalu pilih “*open link in new tab*” lalu klik FASTA, maka urutan basa gen COI dapat di *copy*



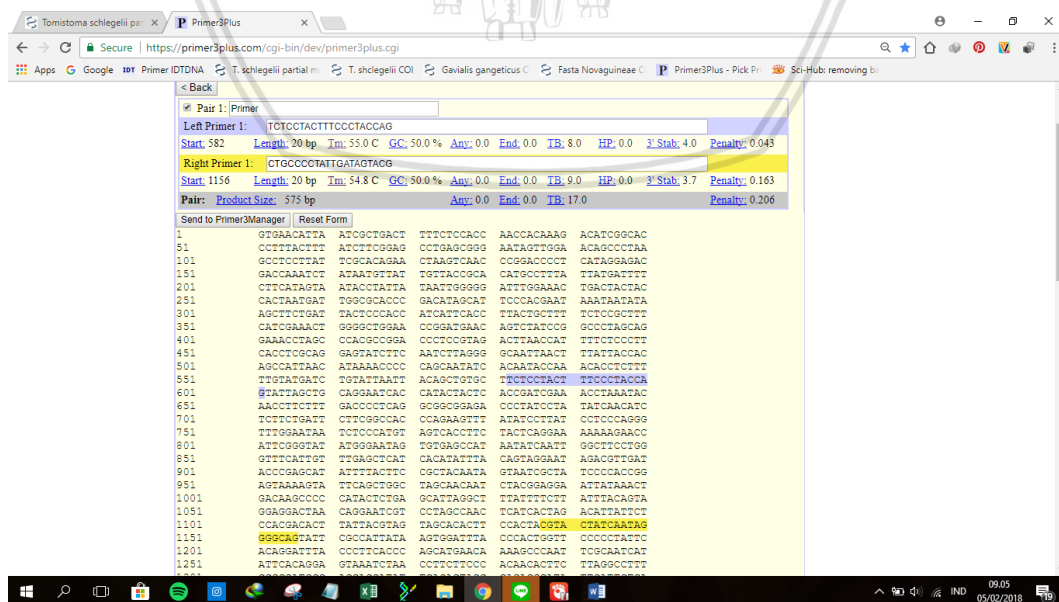
- e. Dibuka website Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).



- f. Sekuens DNA dari Fasta NCBI yang telah *copy* selanjutnya dipaste di lokasi *paste souce sequence below* seperti tampilan berikut dan diklik ikon *Pick Primer*. Sebelum langkah diatas, tersedia pula kolom *General setting* untuk mengatur pencarian primer berdasarkan panjang primer, Tm, %GC, dan lain sebagainya sesuai kebutuhan.

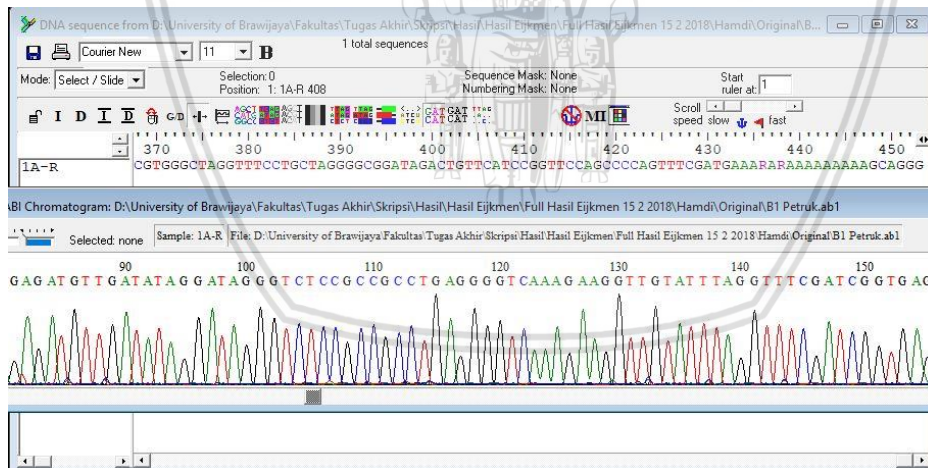


- g. Klik pick primer lalu muncul sebagai berikut



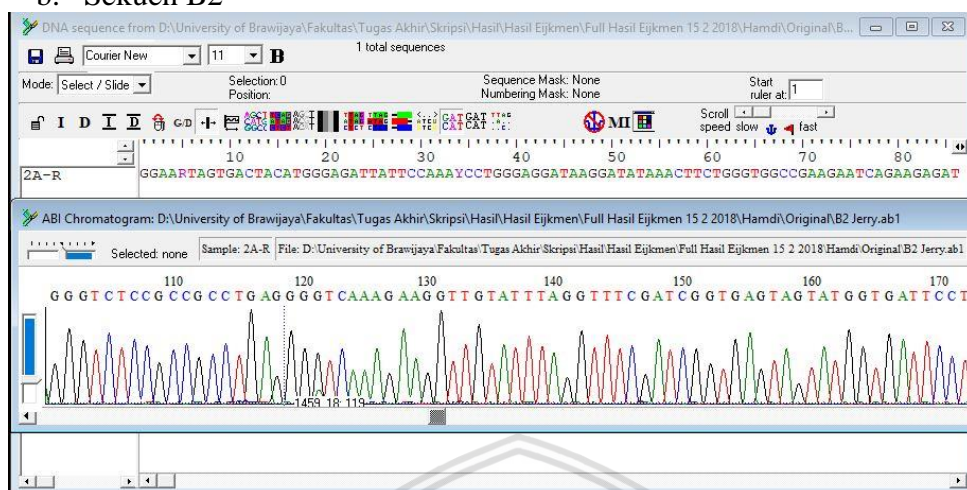
Desain primer dilakukan sendiri hingga ditemukan primer *forward* dan *reverse*.

a. Sekuen B1

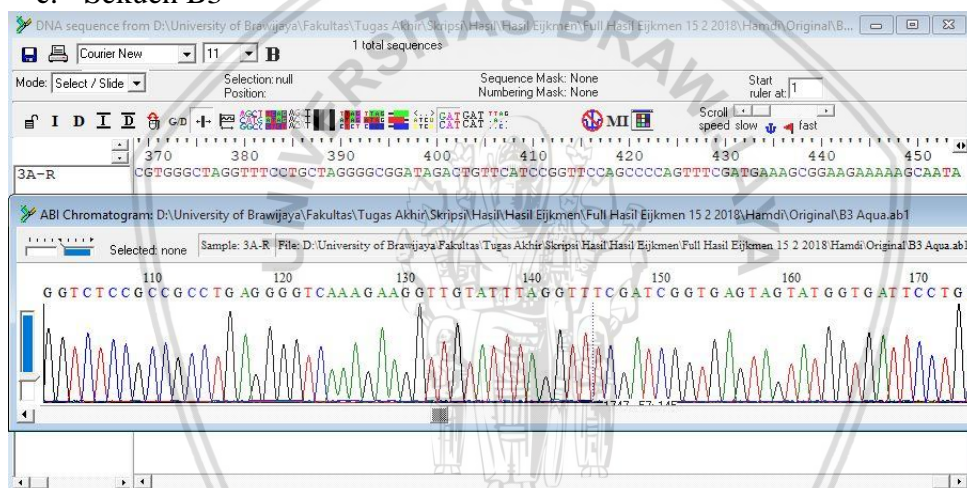




## b. Sekuen B2



## c. Sekuen B3








## Lampiran 6. Hasil BLAST Sekuens B1, B2, dan B3

### a. BLAST B1

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments								Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession					
	<a href="#">Tomistoma schlegelii partial mitochondrion</a>	776	776	94%	0.0	99%	<a href="#">AJ810455.1</a>					
	<a href="#">Tomistoma schlegelii cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>	582	582	71%	3e-162	99%	<a href="#">JN090129.1</a>					
	<a href="#">Gavialis gangeticus isolate UP10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochon</a>	486	486	92%	2e-133	88%	<a href="#">HM490386.1</a>					

### b. BLAST B2

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments							Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results	
Description		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession				
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Tomistoma schlegelii partial mitochondrion</a>	780	780	97%	0.0	98%	<a href="#">AJ810455.1</a>				
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Tomistoma schlegelii cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>	582	582	71%	3e-162	99%	<a href="#">JN090129.1</a>				
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gavialis gangeticus isolate UP10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>	494	494	92%	1e-135	88%	<a href="#">HM490386.1</a>				
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gavialis gangeticus isolate UP8 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>	494	494	92%	1e-135	88%	<a href="#">HM490384.1</a>				
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Gavialis gangeticus isolate UP7 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>	494	494	92%	1e-135	88%	<a href="#">HM490383.1</a>				

### c. BLAST B3

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments								Download	Genbank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession					
 <a href="#">Tomistoma schlegelii partial mitochondrion</a>		797	797	98%	0.0	99%	<a href="#">AJ810455.1</a>					
 <a href="#">Tomistoma schlegelii cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>		582	582	71%	3e-162	99%	<a href="#">JN090129.1</a>					
 <a href="#">Gavialis gangeticus isolate UP10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>		494	494	94%	1e-135	87%	<a href="#">HM490386.1</a>					
 <a href="#">Gavialis gangeticus isolate UP8 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial</a>		494	494	94%	1e-135	87%	<a href="#">HM490384.1</a>					

## Lampiran 7 Sequence Alignment

	10	20	30	40	50
T. schlegelii AJ810455	CTTTTCTCCGCTTTTCATCGAAACTGGGGCTGGAACCGGATGAACAGTCTATC				
B1 Petruk	T...T...TYTY...				
B2 Jerry	T...T...T...				
B3 Aqua	T...CT...				
G.gangeticus	..C...A..C..G.T...				
C. novaeguineae	..C..T..C...T...C..A...				
	60	70	80	90	100
T. schlegelii AJ810455	TCCGGCCCTAGCAGGAAACCTAGCCACGCCGGACCCTCCGTAGACTTAAC				
B1 Petruk	...C...				
B2 Jerry	...C...				
B3 Aqua	...C...				
G.gangeticus	C...AC.A...				
C. novaeguineae	C...AC.A...				
	110	120	130	140	150
T. schlegelii AJ810455	ATTTTCTCCCTTCACCTCGCAGGAGTATCTTCAATCTTAGGGGCAATTA				
B1 Petruk	...C...				
B2 Jerry	...C...				
B3 Aqua	...C...				
G.gangeticus	...T...G...				
C. novaeguineae	..C...T...T...G...G...A...				

	160	170	180	190	200
T. schlegelii AJ81045	ACTTTATTACCACAGCCATTAACATAAAACCCCCAGCAATATCACAATAC				
B1 Petruk					
B2 Jerry					
B3 Aqua					
G.gangeticus	T		A		
C. novaeguineae	C	G	T	T	G

	210	220	230	240	250
T. schlegelii AJ81045	CAAACACCTCTTTTGTATGATCTGTATTAATTACAGCTGTGCTTCTCCT				
B1 Petruk					
B2 Jerry					
B3 Aqua					
G.gangeticus		C	G	GC	T
C. novaeguineae	C	G	G	TC	G

	260	270	280	290	300
T. schlegelii AJ81045	ACTTTCCCTACCAGTATTAGCTGCAGGAATCACCATACTACTCACCGATC				
B1 Petruk					
B2 Jerry					
B3 Aqua					
G.gangeticus	C	T	C	T	C
C. novaeguineae	C	A	C	CC	T

	310	320	330	340	350
T. schlegelii AJ81045	GAAACCTAAATACAACCTTCTTTGACCCCTCAGGCGGCGGAGACCCTATC				
B1 Petruk					
B2 Jerry					
B3 Aqua					
G.gangeticus	T	C	T	C	T
C. novaeguineae	T	C	C	G	A

	360	370	380	390	400
T. schlegelii AJ81045	CTATATCAACATCTCTTCTGATTCTTCGGCCACCCAGAA GTTTATATCC				
B1 Petruk				R	A
B2 Jerry					
B3 Aqua					
G.gangeticus	G	C	A		C
C. novaeguineae	C	C	T	T	A

	410	420	430	440
T. schlegelii AJ81045	TTATCCTCCCAGGGTTTGAATAATCTCCCATGTAGTCACC			
B1 Petruk				T
B2 Jerry		R		T
B3 Aqua				T
G.gangeticus	C	A	C	T
C. novaeguineae	G	A	T	A



Lampiran 8 Laik Etik

59



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 916-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : ANALISA KEKERABATAN BUAYA SENYULONG  
( *Tomistoma schlegelii* ) BERDASARKAN GEN  
*Cytochrome C Oxidase subunit I* DENGAN  
MENGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN  
REACTION

PENELITI : DINUL HAMDI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 17 Januari 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

  
Prof. Dr. H. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001